



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**Κωνσταντίνος Π. Αρμάος
Χημικός**

Αθήνα 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ**

ΑΡΜΑΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ι. ΠΑΠΟΥΤΣΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ι. ΠΑΠΟΥΤΣΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΚΠΑ

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΕΚΠΑ

Ε. ΓΚΙΚΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΚΠΑ

Στην οικογένεια μου

Η επιτυχία είναι ένα ταξίδι, όχι ο προορισμός

Ben Sweetland

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο πλαίσιο των απαιτήσεων της δικαστικής τοξικολογίας είναι αναγκαία η αναζήτηση και η χρήση εναλλακτικών βιολογικών υλικών όταν το αίμα και τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα ή είναι ακατάλληλα για χρήση.

Σκοπός της παρούσας εργασία ήταν η μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό και η συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους με τις αντίστοιχες στο αίμα με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, «Φαρμακευτική Ανάλυση- Έλεγχος Ποιότητας».

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, Καθηγήτρια κ. Χ. Σπηλιοπούλου για την αποδοχή της στο εργαστήριο για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Προς τον επιβλέπων μου καθηγητή κ. Ιωάννη Παπουτσή θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επίβλεψη, καθοδήγησή καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησης και συγγραφής της μεταπτυχιακής εργασίας καθώς και τη βοήθειά του σε όποια προβλήματα παρουσιάστηκαν. Οι συμβουλές του και η καθοδήγησή του, είναι πολύτιμες και αρωγός για τη συνέχεια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Σωτήρη Αθανασέλη για τη βοήθεια του κατά τη συγγραφή της εργασίας και τις παρατηρήσεις του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Διδάκτορα και φίλη Μαρία Κατσέλου για την αμέριστη βοήθειά της στην εξοικείωση μου με το εργαστήριο καθώς και στις συμβουλές που μου έδινε συνεχώς. Επίσης ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών. Ο ρόλος του καθενός ιδιαίτερα σημαντικός καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ	1
1.1 Γενικά για την κατάθλιψη.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	7
2.1 Εισαγωγή.....	7
2.2 Ταξινόμηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων	7
2.3 Φαρμακευτική χρήση	10
2.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	11
2.5 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και ουσίες	12
2.6 Αντικαταθλιπτικά φάρμακα που μελετώνται στη διατριβή	13
2.6.1 Σερτραλίνη.....	14
2.6.2 Μιρταζαπίνη.....	16
2.6.3 Σιταλοπράμη	18
2.6.4 Φλουοξετίνη.....	19
2.6.5 Αμιτριπυλίνη	21
2.6.6 Νορτριπυλίνη.....	24
2.6.7 Βενλαφαξίνη	26
2.6.8 Κλομιπραμίνη	28
2.6.9 Μαπροτιλίνη	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	31
3.1 Τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων και απομόνωσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.....	31
3.1.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση.....	32
3.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης.....	32
3.2 Χρωματογραφικές αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά	34
3.3 Συνδυασμένη τεχνική αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (GC-MS)	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	43
.....	
4.1 Εισαγωγή.....	43
4.2 Ανατομία και σύνθεση του υαλοειδούς υγρού	43
4.3 Ξενοβιοτική ανταλλαγή αίματος και υαλοειδούς υγρού	44
4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ξενοβιοτική διείδυση στο υαλοειδές υγρό	45
4.5 Δειγματοληψία υαλοειδούς υγρού	46
4.6 Χρήση του υαλοειδούς υγρού στη δικαστική τοξικολογία.....	46
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟΤΕΧΝΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	55
5.1 Αέριο χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματογράφο μαζών (GC-MS).....	55
5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	55
5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια	56
5.4 Στήλες εκχύλισης	57
5.5 Βιολογικό υπόστρωμα.....	57
5.6 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς.....	57
5.7 Μικτά διαλύματα εργασίας σε μεθανόλη για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου	58
5.8 Μικτά διαλύματα εργασία σε μεθανόλη για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων υαλοειδούς υγρού.	59
5.9 Μικτά διαλύματα εργασίας για την μελέτη ειδικότητας της μεθόδου	61
5.10 Ρυθμιστικό διάλυμα.....	61
5.11 Μίγμα διαλυτών έκλυσης της εκχύλισης στερεής φάσης.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	63
6.1 Προκαταρκτική χρωματογραφική ανάλυση	63
6.2 Βελτιστοποίηση της παραγωγοποίησης	63
6.3 Χρωματογραφικές συνθήκες	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΑΛΟΕΙΔΟΥΣ ΥΓΡΟΥ	71
.....	
7.1 Επιλογή εσωτερικού προτύπου	71
7.2 Εκχύλιση στερεής φάσης εμβολιασμένων δειγμάτων υαλοειδούς υγρού	72
7.3 Μέθοδος προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό.....	72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ 75

8.1 Εκλεκτικότητα	75
8.2 Ειδικότητα	75
8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	76
8.4 Γραμμικότητα	76
8.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	77
8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	77
8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών	78
8.8 Απόλυτη ανάκτηση	78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ 81

9.1 Εκλεκτικότητα	81
9.2 Ειδικότητα	86
9.3 Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	86
9.4 Γραμμικότητα	92
9.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	97
9.3 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	104
9.4 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών	104
9.5 Απόλυτη ανάκτηση	114

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ ΣΤΗ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ..... 117

10.1 Εφαρμογές της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό στη Δικαστική Τοξικολογία.....	117
---	-----

ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 121

ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... 125

ABSTRACT..... 126

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 129

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

1.1 Γενικά για την κατάθλιψη

Η κατάθλιψη είναι μία διαταραχή που επηρεάζει τη διάθεση, τις σκέψεις και συνήθως συνοδεύεται και από σωματικές ενοχλήσεις [1,2]. Σήμερα αποτελεί μια από τις συχνότερες ψυχιατρικές διαταραχές παγκοσμίως καθώς επηρεάζει 322 εκ. ανθρώπους και είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία αναπηρίας. Τα στοιχεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (world health organization WHO) δείχνουν πως τα περιστατικά κατάθλιψης έχουν αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. Το ποσοστό των ανθρώπων που αυτοκτονούν είναι 20 φορές μεγαλύτερο σε στα άτομα που πάσχουν από κατάθλιψη συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Υπολογίζεται ότι περίπου 1 στα 10 άτομα εμφανίζει ένα τουλάχιστον καταθλιπτικό επεισόδιο κατά τη διάρκεια της ζωής του [3]. Η κατάθλιψη μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία (στα βρέφη, στα παιδιά, στους εφήβους, στους ενήλικες νέας και μέσης ηλικίας και στους ηλικιωμένους). Τα υψηλότερα ποσοστά έναρξης της διαταραχής απαντώνται στο ηλικιακό φάσμα 15-45 ετών. Η συχνότητα της κατάθλιψης είναι διπλάσια στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε ορμονικούς και κοινωνικούς παράγοντες. Ο αριθμός των καταθλιπτικών επεισοδίων διαφέρει από άτομο σε άτομο και σε μερικές περιπτώσεις το επεισόδιο μπορεί να θεωρηθεί ως υποτροπιάζον [2-4].

Η κατάθλιψη επηρεάζει τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου, τον ύπνο του, τον τρόπο που βλέπει τον εαυτό του και τον τρόπο με τον οποίο σκέφτεται και αντιλαμβάνεται. Διαφέρει από το φυσιολογικό καταθλιπτικό συναίσθημα που περνά σχετικά γρήγορα και έχει μικρότερη ένταση. Στην κατάθλιψη το καταθλιπτικό συναίσθημα έχει μεγάλη ένταση, διαρκεί περισσότερο και οδηγεί σε έκπτωση της λειτουργικότητας του ατόμου σε πολλούς τομείς της ζωής του [4].

Ορισμένοι από τους κυριότερους παράγοντες, που θεωρούνται αίτια της κατάθλιψης, είναι οι εξής:

➤ *Γενετικοί, βιολογικοί παράγοντες*

Έχει βρεθεί ότι μερικές ασθένειες μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση της κατάθλιψης. Οι ασθένειες αυτές επηρεάζουν την λειτουργία των περιοχών του εγκεφάλου που ρυθμίζουν το συναίσθημα. Τέτοιες είναι οι παθήσεις του

Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, όπως η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας κλπ.

Οι ενδοκρινικές και μεταβολικές παθήσεις (π.χ ο υποθυρεοειδισμός), οι λοιμώξεις που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, (π.χ HIV, λοιμώδης μονοκυρήνωση), μερικές μορφές καρκίνου (π.χ παγκρέατος) , διάφορα φάρμακα όπως η κορτιζόνη και ουσίες όπως το αλκοόλ και το χασίς προκαλούν κατάθλιψη. Επίσης διάφορες επιστημονικές έρευνες συνδέουν τη λειτουργία των νευροδιαβιβαστών με την κατάθλιψη. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος δύο νευροδιαβιβαστών, της νοραδρεναλίνης και της σεροτονίνης.

➤ *Ψυχοκοινωνικοί παράγοντες*

Πρώιμες εμπειρίες που συσχετίζονται με κάποια σημαντική απώλεια (πχ. θάνατος αγαπημένου προσώπου, διαζύγιο γονέων) και τις οποίες το άτομο τις βίωσε ως έντονα αρνητικές, πιθανόν το καθιστούν περισσότερο ευάλωτο σε ανάλογες εμπειρίες και αυξάνουν την πιθανότητα να εμφανίσει κατάθλιψη ως απάντηση σε αυτές. Επίσης αρνητικά γεγονότα ζωής, όπως διάλυση προσωπικής σχέσης, ανεργία, οικονομικές δυσκολίες, σε συνδυασμό με την υποκειμενική αίσθηση αδυναμίας αντιμετώπισής τους αυξάνουν τον κίνδυνο για κατάθλιψη. Συνέπεια των παραπάνω είναι το άτομο να έχει διαμορφώσει μία αρνητική θεώρηση του εαυτού του, του κόσμου και του μέλλοντος [5].

Η κατάθλιψη εμφανίζεται με μία σειρά από συμπτώματα που επηρεάζουν πολλούς τομείς της ζωής του ατόμου. Δεν είναι απαραίτητο κάποιος που έχει κατάθλιψη να παρουσιάζει όλα τα συμπτώματα της διαταραχής. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων διαφέρει από άτομο σε άτομο, αλλά μπορεί να διαφοροποιείται και στο ίδιο άτομο με την πάροδο του χρόνου. Τα κύρια συμπτώματα τα οποία μπορεί να εμφανίσει κάποιος όταν πάσχει από κατάθλιψη, είναι τα εξής:

- Καταθλιπτική διάθεση που διαρκεί το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας, σχεδόν κάθε μέρα, για χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων.
- Απώλεια της ευχαρίστησης και μείωση του ενδιαφέροντος για δραστηριότητες.
- Άγχος με τη μορφή εσωτερικής δυσφορίας, φόβου, αισθήματος επικείμενου κινδύνου.
- Διαταραχές στον ύπνο που παρουσιάζονται με διάφορους τρόπους. Μερικοί άνθρωποι με κατάθλιψη κοιμούνται πάρα πολλές ώρες, μερικοί δεν μπορούν να κοιμηθούν καθόλου, ενώ άλλοι ξυπνούν πολλές φορές στη διάρκεια της νύχτας ή δυσκολεύονται να

αποκοιμηθούν. Η πιο συνηθισμένη διαταραχή του ύπνου είναι η πρωινή αφύπνιση, στην οποία το άτομο ξυπνά πολύ νωρίς το πρωί και δεν μπορεί να ξανακοιμηθεί.

- Διαταραχές της όρεξης. Συνήθως η κατάθλιψη προκαλεί απώλεια της όρεξης, με πιθανό επακόλουθο την απώλεια βάρους. Ωστόσο μπορεί σε μικρότερη συχνότητα να παρατηρηθεί το αντίθετο σύμπτωμα, δηλαδή αυξημένη όρεξη για φαγητό και αύξηση του σωματικού βάρους καθώς και κρίσεις βουλιμίας.
- Κόπωση, εξάντληση, απώλεια ενεργητικότητας, ελάττωση της σεξουαλικής διάθεσης.
- Έλλειψη ελπίδας, ανησυχία και απαισιοδοξία για το μέλλον.
- Δυσκολία στη συγκέντρωση, τη σκέψη, τη μνήμη και τη λήψη αποφάσεων. Η ενασχόληση με τις καταθλιπτικές σκέψεις είναι τόσο έντονη και επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό τη συγκέντρωση ώστε συχνά τα άτομα με κατάθλιψη να έχουν δυσκολία στο διάβασμα ή στην παρακολούθηση τηλεόρασης.
- Αισθήματα και σκέψεις ενοχής, αναξιότητας και χαμηλή αυτοεκτίμηση.
- Σωματικά συμπτώματα που δεν ερμηνεύονται από ιατρικές εξετάσεις και δεν ανταποκρίνονται σε φαρμακευτική αγωγή και θεραπεία όπως : πονοκέφαλοι, πόνοι στη μέση, κράμπες, ναυτία, εμετός, δυσκοιλιότητα, δυσκολία στην αναπνοή, πόνος στο στήθος.
- Εμμονή σε σκέψεις θανάτου και ιδέες αυτοκτονίας. Μερικές φορές το άτομο που έχει κατάθλιψη νιώθει τόσο απελπισμένο που κάνει σκέψεις αυτοκτονίας. Η απόπειρα αυτοκτονίας είναι η πιο σοβαρή και επικίνδυνη επιπλοκή της κατάθλιψης. Σε άτομα με βαριά κατάθλιψη ο κίνδυνος αυτοκτονίας είναι ιδιαίτερα αυξημένος [5,6].

1.2 Μορφές κατάθλιψης

Οι διαταραχές της διάθεσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες . Η πρώτη περιλαμβάνει ασθενείς που εκδηλώνουν μόνο κατάθλιψη, η οποία αναφέρεται συχνά ως μονοπολική διαταραχή, καθώς η διαταραχή αυτή αφορά μόνο στον ένα πόλο του φάσματος των διαταραχών της διάθεσης. Η δεύτερη κατηγορία ασθενών αναφέρεται ως διπολική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από την εκδήλωση της μανίας και οι ασθενείς μπορεί να έχουν ιστορικό κατάθλιψης. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες των διαταραχών της διάθεσης, τον μονοπολικό και διπολικό τύπο. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται η μείζων

καταθλιπτική διαταραχή, η δυσθυμική διαταραχή και η καταθλιπτική διαταραχή μη προσδιοριζόμενη αλλιώς.

Μείζων Καταθλιπτική Διαταραχή: Εκδηλώνεται με ένα συνδυασμό συμπτωμάτων που επηρεάζουν την ικανότητα του ατόμου να εργαστεί, να μελετήσει, να κοιμηθεί, να φάει, και να απολαύσει ευχάριστες δραστηριότητες, όπως έκανε στο παρελθόν για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 2 εβδομάδων. Σε αυτήν υπάρχει τουλάχιστον ένα καταθλιπτικό επεισόδιο.

Δυσθυμική Διαταραχή: Είναι μία χρόνια καταθλιπτική διάθεση, που το άτομο την έχει το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας, τις περισσότερες ημέρες, για τουλάχιστον 2 χρόνια. Δεν καθιστά το άτομο ανίκανο, αλλά εξαιτίας της μακροχρόνιας καταθλιπτικής διάθεσης, δεν το αφήνει να αισθανθεί και να λειτουργήσει καλά.. Όταν στο άτομο γίνεται συνδυασμός της με το μείζων καταθλιπτικό επεισόδιο τότε αναφέρεται αρκετές φορές ως διπλή κατάθλιψη.

Καταθλιπτική διαταραχή μη προσδιοριζόμενη διαφορετικά: Στην κατηγορία αυτή υπάγονται κυρίως:

- η προεμμηνορρυσιακή δυσφορική διαταραχή (η εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων λίγες μέρες πριν την έναρξη της έμμηνου ρύσης)
- η ελάσσων καταθλιπτική διαταραχή (τα συμπτώματα δεν έχουν την ίδια βαρύτητα με αυτά της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής)
- η υποτροπιάζουσα βραχεία καταθλιπτική διαταραχή (όπου τα συμπτώματα είναι μεν σημαντικής βαρύτητας, δεν διαρκούν όμως αρκετά ώστε να πληρούν τα κριτήρια της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής)
- η μεταψυχωσική καταθλιπτική συνδρομή, η εμφάνιση δηλαδή καταθλιπτικών συμπτωμάτων ως συνέχεια ενός ψυχωτικού επεισοδίου.

Διπολικές διαταραχές (I και II): Στις Διπολικές διαταραχές τα άτομα παρουσιάζουν διαστήματα κατάθλιψης και διαστήματα ευφορικής διάθεσης που ονομάζεται μανία και χαρακτηρίζεται από υπερκινητικότητα, διέγερση και επιταχυμένο ρυθμό ομιλίας- συχνά με διαταραγμένη σκέψη ή διαστήματα υπομανίας. Η υπομανία είναι ένα σύνδρομο παρόμοιο με την μανία, αλλά όχι τόσο βαρύ ή έντονο και δεν επηρεάζει τόσο σημαντικά την λειτουργικότητα

Πιο συγκεκριμένα το βασικό στοιχείο της διπολικής διαταραχής τύπου I είναι η παρουσία ενός ή περισσότερων μανιακών ή μεικτών επεισοδίων (το μεικτό επεισόδιο είναι συνδυασμός μανιακού

και καταθλιπτικού επεισοδίου). Τα άτομα με διπολική διαταραχή τύπου I έχουν και ένα ή περισσότερα μείζονα καταθλιπτικά επεισόδια.

Όσον αφορά την Διπολική Διαταραχή τύπου II, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός ή περισσότερων μείζονων καταθλιπτικών επεισοδίων που συνοδεύονται τουλάχιστον από ένα υπομανιακό επεισόδιο. Η συμπεριφορά των ατόμων αυτών τις περισσότερες φορές δεν γίνεται αντιληπτή από τους άλλους ως προβληματική αντίθετα μπορεί να θεωρούνται άτομα ιδιαίτερα ζωντανά και ενεργητικά.

Κυκλοθυμική Διαταραχή: Το βασικό χαρακτηριστικό της κυκλοθυμικής διαταραχής είναι μία χρόνια κατάσταση διαταραχής της διάθεσης που παρουσιάζει συνεχώς διακυμάνσεις. Έτσι, για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 2 ετών παρατηρούνται πολυάριθμες περίοδοι με υπομανιακά συμπτώματα καθώς και πολυάριθμες περίοδοι με καταθλιπτικά συμπτώματα, που δεν πληρούν όμως ποτέ τα κριτήρια για μείζον καταθλιπτικό επεισόδιο [6].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1 Εισαγωγή

Πριν από τη δεκαετία του 1950, τα οπιοειδή και οι αμφεταμίνες χρησιμοποιήθηκαν συνήθως ως αντικαταθλιπτικά. Η χρήση τους περιορίστηκε αργότερα λόγω της εθιστικής φύσης και των παρενεργειών τους [7,8].

Το πρώτο αντικαταθλιπτικό φάρμακο που αναπτύχθηκε ήταν η ιπρονιαζίδη κατά τη δεκαετία του 1950. Πρόκειται για ένα μη επιλεκτικό, αναστρέψιμο αναστολέα της μονοαμινοξειδάσης και ανήκει στην οικογένεια της υδραζίνης. Η ιπρονιαζίδη σχεδιάστηκε αρχικά για τη θεραπεία της φυματίωσης, αλλά αργότερα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο. Ωστόσο, αποσύρθηκε από την αγορά λόγω της ηπατοτοξικότητάς της [9-11].

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα άρχισαν να συνταγογραφούνται τη δεκαετία του 1950. Η αντικαταθλιπτική δράση των τρικυκλικών ανακαλύφθηκε το 1957 από τον Roland Kuhn σε ψυχιατρική κλινική της Ελβετίας όταν ανακάλυψε την ιμιπραμίνη. Ο πρώτος επιλεκτικός αναστολέας πρόσληψης της σεροτονίνης, ήταν η φλουοξετίνη που προτάθηκε από την ομάδα του Wong το 1973 στην Ινδιανάπολη των Η.Π.Α στην προσπάθειά τους να αναπτύξουν ως φάρμακο έναν αναστολέα πρόσληψης της σεροτονίνης [12].

2.2 Ταξινόμηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης αλλά και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών. Σήμερα, τρεις βασικές κατηγορίες αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι ευρέως αποδεκτές στη θεραπεία της κατάθλιψης. Αυτές είναι τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (TCA), αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (MAOI) και εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs) [13].

Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά έχουν εισαχθεί εδώ και πολλά χρόνια για τη θεραπεία της κατάθλιψης, παρόλα αυτά η θεραπεία με αυτές τις ενώσεις ήταν ανεπαρκής για το 30-50% των ασθενών [14], λόγω των ανεπιθύμητων παρενεργειών τους, του μικρού θεραπευτικού εύρους και της φαρμακοκινητικής διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων. Αυτά αποκλείουν τη πρόσληψη της σεροτονίνης και της νορεπινεφρίνης στο νευρώνα. Η παρατεταμένη θεραπεία με τη χρήση αυτών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές ορισμένων ομάδων υποδοχέων του κεντρικού νευρικού

συστήματος. Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά έχουν παρόμοια φαρμακολογική αποτελεσματικότητα και η επιλογή του κατάλληλου φαρμάκου εξαρτάται από την ανοχή του ασθενούς στις εκάστοτε ανεπιθύμητες ενέργειες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ιμιπραμίνη, η αμιτριπτυλίνη, η δεσιπραμίνη, η νορτριπτυλίνη, η προτριπτυλίνη και η δοξεπίνη. Η μαπροτιλίνη και η αμοξαπίνη ανήκουν στη ‘‘δεύτερη γενιά’’ των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων για να ξεχωρίζουν από τα παλαιότερα. Κατά άλλους η μαπροτιλίνη ταξινομείται και ως τετρακυκλικό αντικαταθλιπτικό. Η δράση τους είναι παρόμοια με των παλαιότερων (ιμιπραμίνης), αλλά διαφέρουν ελαφρώς στη φαρμακοκινητική τους. Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά όταν χορηγούνται από το στόμα απορροφούνται και εξαιτίας της λιποφιλίας τους διεισδύουν εύκολα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και παρουσιάζουν αυξημένο χρόνο ημιζωής. Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά μεταβολίζονται από το ηπατικό μικροσωμικό σύστημα.

Οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (MAO) δημιουργήθηκαν γιατί η ιπρονιαζίδα ανακαλύφθηκε ότι ήταν ένας ισχυρός αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης. Αρχικά προοριζόταν για τη θεραπεία της φυματίωσης. Η ανακάλυψη των 2 ισοενζύμων της MAO έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων μονοαμινοξειδάσης (monoaminoxidase inhibitors, MAOI) που μπορεί να έχουν ένα ευνοϊκότερο προφίλ παρενεργειών συγκριτικά με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά [15].

Η μονοαμινοξειδάση είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που βρίσκεται στο νευρικό σύστημα αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως το ήπαρ και το έντερο. Αυτή λειτουργεί αδρανοποιώντας και απαμινώνοντας οξειδωτικά όσα μόρια νευροδιαβιβαστών διαφεύγουν από τα συναπτικά κυστίδια όταν ο νευρώνας βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας. Οι αναστολείς αυτοί μπορούν να αδρανοποιήσουν αναστρέψιμα ή μόνιμα το ένζυμο, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό στα μόρια του νευροδιαβιβαστή να αποφεύγουν τη διάσπαση και να συσσωρεύονται στον προσυναπτικό νευρώνα διαφεύγοντας με τον τρόπο αυτό το συναπτικό χάσμα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ισοκαρβαζίδα, η τρανυλκυπρομίνη και η φαινελζίνη. Οι περισσότεροι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης σχηματίζουν σταθερά συμπλέγματα με το ένζυμο προκαλώντας μη αναστρέψιμη αδρανοποίησή του. Έτσι αυξάνονται τα επίπεδα της νορεπινεφρίνης, της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης στον νευρώνα. Τα φάρμακα αυτά απορροφούνται όταν χορηγούνται από το στόμα αλλά η αντικαταθλιπτική τους δράση απαιτεί

διάστημα 2-4 εβδομάδες θεραπείας [16]. Υπάρχουν δύο ισοέζυμα της μονοαμινοξειδάσης, τα MAO_A και τα MAO_B. Τα MAO_A είναι υπεύθυνα για την ενζυμική δραστικότητα που χρησιμοποιούνται στην απαμίνωση της σεροτονίνης, της νοραδρεναλίνης της αδρεναλίνης και της μελανίνης. Τα MAO_B είναι υπεύθυνα για την ενζυμική δραστικότητα της διάσπασης της φαιναθυλαμίνης και της βενζυλαμίνης [17].

Η τρίτη ομάδα αντικαταθλιπτικών, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης, έχουν εισαχθεί πιο πρόσφατα. Σε αντίθεση με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης δεν αναστέλλουν σημαντικά την επαναπρόσληψη της νορεπινεφρίνης στις νευρικές απολήξεις. Αυτοί δρουν αναστέλλοντας επιλεκτικά την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης [18-20]. Επιπλέον, δρουν ως επί το πλείστον δίχως να παρουσιάζουν αντι-χολινεργικές και αντι-αδρενεργικές ιδιότητες [21]. Ωστόσο, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης είναι συγκρίσιμοι με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά στην κλινική τους αποτελεσματικότητα και, λόγω του ευνοϊκού φαρμακολογικού προφίλ τους αποτελούν ασφαλή και καλά ανεκτά φάρμακα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η φλουοξετίνη, η τραζοδόνη, η βενλαφαξίνη, η παροξετίνη, η σερτραλίνη, η φλουβοξαμίνη και η νεφαζοδόνη. Οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης πλεονεκτούν καθώς η τοξική τους δόση είναι αρκετά υψηλή και επομένως είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί από κάποιο άτομο ως τρόπος αυτοκτονίας, ενώ και οι παρενέργειες τους είναι πιο ήπιες σε σχέση με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα [22, 23, 24].

Εκτός από αυτές τις κατηγορίες υπάρχουν και άλλες μικρότερες κατηγορίες των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων όπως τα νοραδρενεργικά και σεροτονεργικά φάρμακα στα οποία ανήκουν η μιανσερίνη, η απταζίνη, η εσμιρταζαπίνη και η μιρταζαπίνη. Αυτά δρουν ανταγωνιζόμενα τον α₂-αδρενεργικό υποδοχέα και ορισμένους υποδοχείς της σεροτονίνης όπως 5-HT_{2A} και 5-HT_{2C}, καθώς και τους 5-HT₃, 5-HT₆ και/ή 5-HT₇ σε μερικές περιπτώσεις. Επιπλέον, επειδή με τον τρόπο αυτό αποκλείουν ορισμένους υποδοχείς της σεροτονίνης, η σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση δεν διευκολύνεται και έτσι αποτρέπεται η εμφάνιση πολλών παρενεργειών που συχνά συνδέονται με τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης [24].

2.3 Φαρμακευτική χρήση

Η κύρια ένδειξη των αντικαταθλιπτικών είναι η μείζων κατάθλιψη καθώς και η μονοπολική ή διπολική διαταραχή. Στην παραληρητική μορφή απαιτείται ταυτόχρονη χορήγηση αντιψυχωσικού φαρμάκου, ενώ η άτυπη κατάθλιψη ανταποκρίνεται καλύτερα στη θεραπεία με αναστολείς της MAO. Εκτός από την κατάθλιψη ορισμένα αντικαταθλιπτικά είναι αποτελεσματικά και στην αντιμετώπιση διαταραχής πανικού με ή χωρίς αγοραφοβία, ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής, κοινωνικής φοβίας, γενικευμένης αγχώδους διαταραχής, καθώς και σε άλλες καταστάσεις, όπως την ψυχογενή βουλιμία και το μετατραυματικό στρες.

Τα αντικαταθλιπτικά είναι αποτελεσματικά σε ποσοστό 70-80% των περιπτώσεων μείζονος κατάθλιψης. Στο υπόλοιπο ποσοστό το αποτέλεσμα τους μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη αλάτων λιθίου, καρβामαζεπίνης, τριωδοθυρονίνης (T3) κ.ά. Τα άλατα του λιθίου και η καρβामαζεπίνη χρησιμοποιούνται σε δόσεις χαμηλότερες των συνήθων θεραπευτικών για την ενίσχυση της δράσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε περιπτώσεις ανθεκτικής κατάθλιψης. Εφόσον δεν υπάρξει βελτίωση σε 4-6 εβδομάδες, η περίπτωση θα πρέπει να θεωρηθεί ανθεκτική στη συγκεκριμένη θεραπεία. Ο περαιτέρω χειρισμός απαιτεί είτε χορήγηση αντικαταθλιπτικού άλλης χημικής κατηγορίας ή ενίσχυση της θεραπείας με άλατα λιθίου, ψυχοθεραπεία ή ηλεκτροσπασμοθεραπεία. Ηλικιωμένοι ασθενείς απαιτούν μικρότερες δόσεις (1/2-1/3 της συνήθους).

Συχνή αιτία αποτυχίας της αντικαταθλιπτικής θεραπείας είναι η ανεπαρκής δοσολογία και ο ανεπαρκής χρόνος θεραπείας. Μετά την υποχώρηση της καταθλιπτικής συμπτωματολογίας η θεραπεία θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον για 4-6 μήνες στην ίδια δοσολογία και σε μειωμένη δόση συντήρησης για ακόμα 6-12 μήνες ή και περισσότερο, ενώ στην περιοδική κατάθλιψη θα πρέπει να συνεχίζεται για περίπου 5 χρόνια. Η διακοπή της θεραπείας πρέπει να γίνεται σταδιακά σε διάστημα κατά προτίμηση 4 εβδομάδων περίπου ή και περισσότερο αν η θεραπεία συντήρησης ήταν μακροχρόνια [25].

Τα αντικαταθλιπτικά από την εποχή της εισαγωγής τους στον κόσμο του φαρμάκου, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια ευρεία ποικιλία ασθενειών που περιλαμβάνουν και ασθένειες του γαστρεντερικού σωλήνα. Στη δεκαετία του 1950, τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα αποδείχτηκαν ότι έχουν κάποια αποτελεσματικότητα για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις αντισταμινικές και αντιχολινεργικές τους επιδράσεις. Από τότε, έχουν καταστεί

διαθέσιμες πιο αποτελεσματικές και περισσότερο ειδικές θεραπείες για τη νόσο. Τα τελευταία χρόνια, τα αντικαταθλιπτικά έχουν χρησιμοποιηθεί όλο και περισσότερο για τη θεραπεία των λειτουργικών γαστρεντερικών διαταραχών όπως το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, τον μη καρδιακό πόνο στο στήθος και άλλες λειτουργικές διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος [26].

Σε μερικές περιπτώσεις, τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στη δερματολογία λόγω μερικών εκ των φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων που δεν σχετίζονται άμεσα με την αντικαταθλιπτική δράση τους. Οι αντιϊσταμινικές και αντιχολινεργικές ιδιότητες των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών είναι σημαντικοί λόγοι για την αποτελεσματικότητά τους. Τα δερματικά αιμοφόρα αγγεία διαθέτουν υποδοχείς ισταμίνης H1 και H2 και η συνδυασμένη θεραπεία των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με H1 και H2 αντιϊσταμινικά φάρμακα είναι πιο αποτελεσματική από τη θεραπεία μόνο με αντιϊσταμινικά φάρμακα στην αντιμετώπιση της χρόνιας κνίδωσης [27].

2.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Κατά τη χορήγηση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι αρκετά πιθανό να εμφανιστούν ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να είναι ενοχλητικές, ιδίως στην αρχή της θεραπείας ενός ατόμου. Απαιτείται προσοχή όταν χορηγούνται τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα σε ασθενείς με κίνδυνο αυτοκτονίας και συγκεκριμένα τα τρικυκλικά όταν ληφθούν σε μεγάλες δόσεις λόγω της καρδιοτοξικότητας. Πρέπει να γίνεται προσεκτική εκτίμηση για το ενδεχόμενο κινδύνου απόπειρας αυτοκτονίας, τόσο στην αρχή όσο και στην πορεία της θεραπείας. Οι ασθενείς με κίνδυνο αυτοκτονίας δεν πρέπει να έχουν στην κατοχή τους οι ίδιοι μεγάλη ποσότητα φαρμάκου. Ορισμένα αντικαταθλιπτικά έχουν ελαφρές αντιχολινεργικές ιδιότητες ή στερούνται αυτών όπως τραζοδόνη, μιανσερίνη καθώς και τα νεότερα αντικαταθλιπτικά, όπως οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης ή οι αναστολείς επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης και σεροτονίνης [25].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται κατά τη χορήγηση των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών περιλαμβάνονται η καταστολή, η ορθοστατική υπόταση, οι αντιμυοκαρικές δράσεις κατά τις οποίες ο αποκλεισμός των υποδοχέων προκαλεί θόλωση της όρασης, ξηροστομία, κατακράτηση ούρων κ.α. Επίσης προκαλείται υπερδιέγερση της καρδιάς λόγω της αυξημένης δράσης των κατεχολαμινών.

Οι αναστολείς της μονοαμινοοξειδάσης προκαλούν συχνά ανεπιθύμητες και σοβαρές ενέργειες που περιορίζουν σημαντικά τη χρήση τους. Η θεραπεία με τη χρήση των αναστολέων της μονοαμινοοξειδάσης μπορεί να είναι επικίνδυνη σε περιπτώσεις ασθενών με βαριάς μορφής κατάθλιψη και αυτοκτονικές τάσεις.

Στους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης εμφανίζονται διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ναυτία, απώλεια βάρους, αϋπνία, ανορεξία, άγχος, τρόμος και σεξουαλική δυσλειτουργία. Πολλές φορές η αποτυχία ανοχής του φαρμάκου από έναν ασθενή οδηγεί σε δοκιμή ενός άλλου εκλεκτικού αναστολέα επαναπρόσληψης της σεροτονίνης [16].

2.5 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και ουσίες

Έχει βρεθεί μια θετική σχέση μεταξύ της κατάθλιψης και της κατανάλωσης αλκοόλ. Η συσχέτιση της μεγάλης κατανάλωσης αλκοόλ με την κατάθλιψη εγείρει την ανησυχία ότι η βαριά κατανάλωση αλκοόλ από άτομα που λαμβάνουν αντικαταθλιπτικά φάρμακα μπορεί να εξουδετερώσει οποιοσδήποτε ευεργετικές επιδράσεις προκύπτουν από τη λήψη των φαρμάκων αυτών. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις αλκοόλ φαρμάκου είναι δυνατές με ορισμένους τύπους αντικαταθλιπτικών [28]. Συνιστάται να αποφεύγεται η κατανάλωση αλκοόλ από άτομα που λαμβάνουν αντικαταθλιπτικά φάρμακα, κυρίως τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης καθώς υπάρχει κίνδυνος να προκληθεί ραβδομυόλυση [29].

Φαρμακευτικά προϊόντα που περιέχουν το δραστικό συστατικό φυτικής προέλευσης St John'swort (Βαλσαμόχορτο) ή και χρησιμοποιούνται για ήπια κατάθλιψη δεν πρέπει να συγχωρηγούνται με αντικαταθλιπτικά, λόγω του κινδύνου σοβαρών αλληλεπιδράσεων [25].

Σημαντική είναι η αλληλεπίδραση των αντικαταθλιπτικών με την ταμοξιφαίνη. Πρόκειται για ένα προφάρμακο το οποίο οφείλει τη δράση του στους ενεργούς μεταβολίτες, με τον σημαντικότερο από αυτούς να είναι η ενδοξιφαίνη. Αυτή η διαδικασία επηρεάζεται από το ισοένζυμο 2D6 του κυτοχρώματος P450 (CYP2D6). Το ένζυμο αυτό χαρακτηρίζεται από έντονη μεταβολή από άτομο σε άτομο. Ορισμένοι από τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης αναστέλλουν το CYP2D6, πιθανώς εξασθενίζοντας ή ακόμα και καταργώντας τα οφέλη της ταμοξιφαίνης [30].

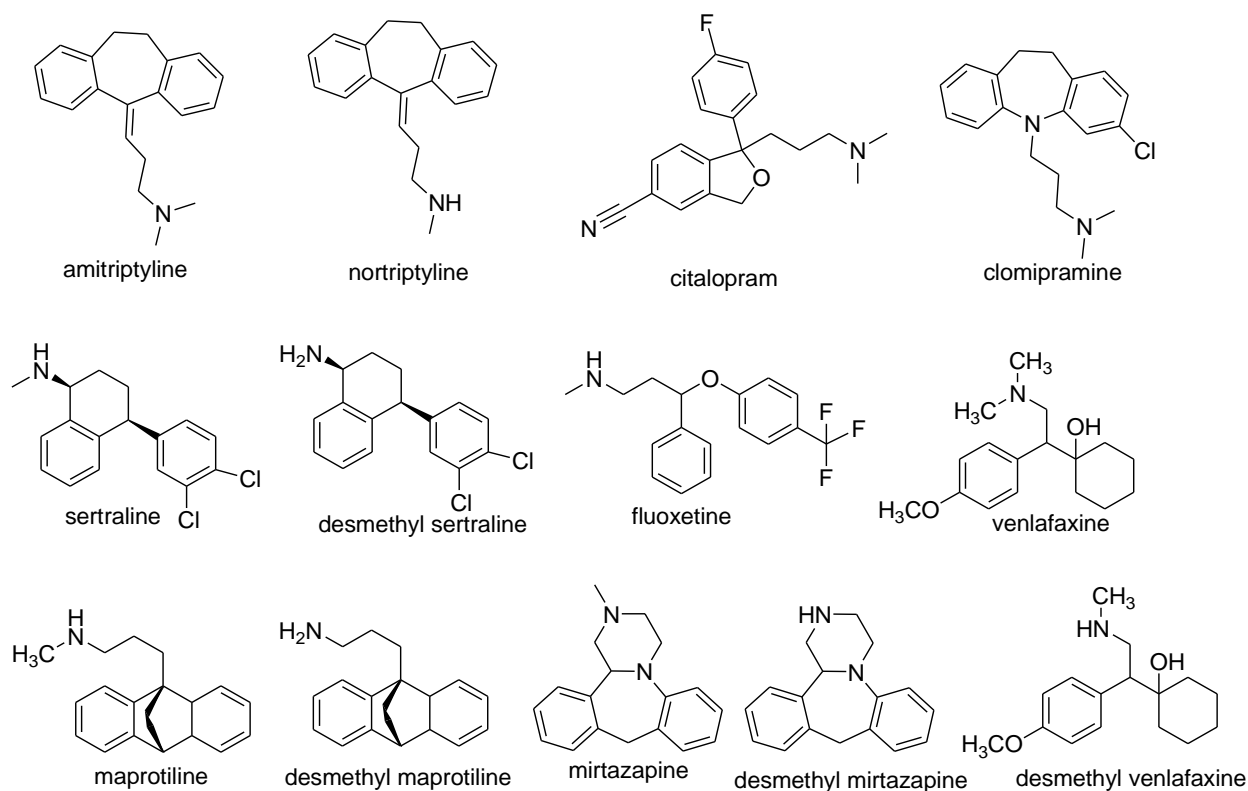
Έχει αποδειχθεί ότι τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με την κωδεΐνη. Η κωδεΐνη μεταβολίζεται σε μορφίνη μέσω των ισοενζύμων 2D6 του κυτοχρώματος P450

(CYP2D6). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κλινική επίδραση της κωδεΐνης να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δραστικότητα του CYP2D6. Αυτή η δραστικότητα όμως ελαττώνεται από τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και τους αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της νορεπινεφρίνης που δρουν είτε ως ισχυροί είτε ως μέτριοι αναστολείς του CYP2D6. Συνιστάται να αποφεύγεται η συγχορήγηση ενός αναστολέα του CYP2D6 με την κωδεΐνη ή η αναζήτηση μιας εναλλακτικής θεραπείας για τον πόνο [31].

Υπάρχει μια ανησυχία που σχετίζεται με όλα τα σεροτονεργικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα όταν αυτά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα με την τραμαδόλη, λόγω της πιθανότητας να υπάρξει τυχόν μια αλληλεπίδραση φαρμάκου-φαρμάκου με αποτέλεσμα να εκδηλωθεί σεροτονινεργικό σύνδρομο. Περιστατικά χορήγησης τραμαδόλης σε συνδυασμό με αντικαταθλιπτικά φάρμακα σε θεραπευτικές δόσεις δίνει μικρές πιθανότητες για ανάπτυξη του συνδρόμου της σεροτονίνης αλλά αυτό δεν αποτελεί αντένδειξη στη χρήση τους. Η τραμαδόλη αντενδείκνυται μόνο σε ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων της μονοαμινοξειδάσης, όχι όμως στη χορήγηση της με άλλα αντικαταθλιπτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα [32].

2.6 Αντικαταθλιπτικά φάρμακα που μελετώνται στη διατριβή

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στον Ελλαδικό χώρο και τα οποία μελετήθηκαν στη παρούσα διατριβή είναι η αμιτριπτυλίνη, η σιταλοπράμη η κλομιπραμίνη, η φλουοξετίνη, η μαπροτιλίνη, η μιλταζαπίνη, η νορτριπτυλίνη, η σερτραλίνη και η βενλαφαξίνη. Η χημική δομή των 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων καθώς και τεσσάρων μεταβολιτών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Η χημική δομή των 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

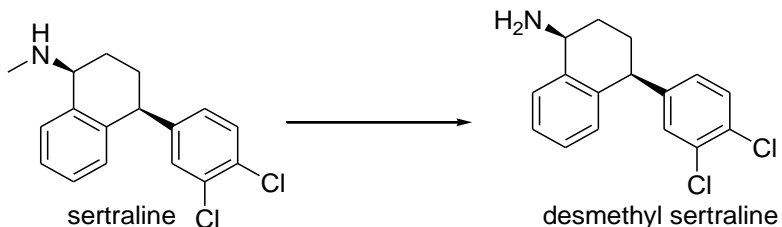
2.6.1 Σερτραλίνη

Η σερτραλίνη ((1S, 4S)-4-(3,4-διχλωροφαινυλ)-1,2,3,4-τετραϋδρο-1-ναφθυλ(μεθυλ)αμίνη) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαταθλιπτικό που ανήκει στους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRI) [33]. Η αποτελεσματικότητά της έχει αποδειχθεί όχι μόνο στη θεραπεία της μείζονος κατάθλιψης, των εμμονών καταναγκαστικών διαταραχών και των διαταραχών που οφείλονται στον πανικό [34,35], αλλά και στη βουλιμία, τις προεμμηνόρροϊκές δυσφορίες και τις διαταραχές του μετατραυματικού στρες [36]. Οι ημερήσιες δόσεις της κυμαίνονται από 50 έως 200 mg. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί με τη μορφή υδροχλωρικού άλατος σε δισκία των 50 mg ή 100 mg με την εμπορική ονομασία ZOLOFT, αλλά και με τη μορφή γενόσημου φαρμάκου [25].

Το φάρμακο απορροφάται αργά μετά την από του στόματος χορήγηση, με συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης στο πλάσμα μεταξύ 55 και 250 ng/mL.

Η σερτραλίνη εμφανίζει γραμμική φαρμακοκινητική και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα εμφανίζονται περίπου 4-8 ώρες μετά από μια εφάπαξ δόση από του στόματος. Εμφανίζει υψηλή σύνδεση πρωτεΐνης πλάσματος, περίπου 98% ενώ ο χρόνος ημιζωής είναι περίπου 24 ώρες [37].

Ο ηπατικός μεταβολισμός οδηγεί στον ασθενή ενεργό μεταβολίτη N-δεσμεθυλσερτραλίνη ((1S, 4S) -4- (3,4-διχλωροφαινυλ) -1,2,3,4- τετραϋδρο-1-ναφθυλαμίνη (DMS)) (Σχήμα 2). Η φαρμακολογική δραστηριότητα του φαρμάκου οφείλεται στην επιλεκτική αναστολή της ανασυγκρότησης της προσυναπτικής σεροτονίνης και την αναστολή της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης που έχει ως αποτέλεσμα την ελάχιστη μεταφορά νοραδρεναλίνης ή ντοπαμίνης [36,38].



Σχήμα 2: Βιομετατροπή της σερτραλίνης

Η σερτραλίνη παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές παρενέργειες του εκλεκτικού αναστολέα επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και πιο συχνά γαστρεντερικές διαταραχές, σεξουαλικές δυσλειτουργίες και άγχος. Λιγότερο συχνά είναι η ανορεξία, η κατακράτηση ούρων και η ορθοστατική υπόταση [39].

Τόσο η σερτραλίνη όσο και ο μεταβολίτης της έχουν υψηλή χημική συγγένεια *in-vitro* για τη Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, έναν μεταφορέα φαρμάκου που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1*. Τρεις απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο (C3435T, C1236T και G2677T/A) έχουν μελετηθεί μαζί. Επιπλέον, άλλοι πολυμορφισμοί στο *ABCB1* οι οποίοι προηγουμένως έχει βρεθεί πως σχετίζονται με την ύφεση και τις παρενέργειες της κατάθλιψης έλαβαν θεραπεία με σερτραλίνη. Είναι αναγκαίο να διευκρινιστεί η επίδραση των πολυμορφισμών *ABCB1* στη φαρμακοκινητική της σερτραλίνης, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν αυτές τις διαφορές στην ύφεση και τις παρενέργειες μεταξύ ατόμων με διαφορετικούς γονότυπους *ABCB1* [40].

Σε μία μελέτη σε 31 ασθενείς που είχαν λάβει υπερβολική δόση σερτραλίνης με μέση δόση 1109mg η μέση συγκέντρωση της σερτραλίνης στο πλάσμα ήταν 245 mg/L, 5 περίπου ώρες από τη στιγμή της λήψης. Όλοι οι ασθενείς επιβίωσαν αφότου εκδήλωσαν συμπτώματα που περιελάμβαναν εμετό, ληθαργία και αταξία. Επιληπτικές κρίσεις, έντονη ταχυκαρδία έχουν επίσης περιγραφεί. Μία γυναίκα που έλαβε 8 g του φαρμάκου παρουσίασε σύγχυση και διέγερση με τα επίπεδα του ορού να είναι 2930 mg/L για τη σερτραλίνη και 1678 mg/L για τη δεσμεθυλοσερτραλίνη. Τα επίπεδα μειώθηκαν σε 453 mg/L και 1132 mg/L αντίστοιχα μετά την πάροδο τριών ημερών από τη λήψη του φαρμάκου [41].

2.6.2 Μιρταζαπίνη

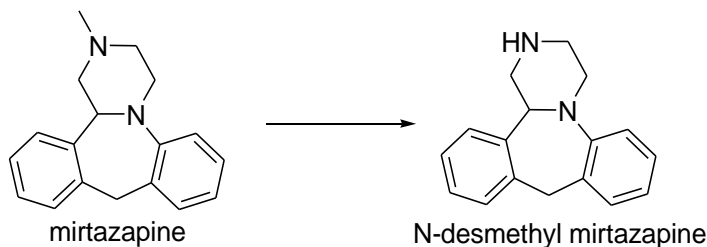
Η μιρταζαπίνη είναι ένα ρακεμικό μίγμα 1,2,3,4,10,14b-εξαϋδρο-2-μεθυλοπυραζινο- [2,1-α] -πυριδο [2,3-c] βενζαζεπίνης, το οποίο ανήκει στην κατηγορία ενώσεων γνωστές ως πιπεραζινοαζεπίνες [2, 42].

Η μιρταζαπίνη ανήκει στην κατηγορία των αντικαταθλιπτικών διπλής δράσης που επηρεάζει τόσο την νοραδρενεργική όσο και την σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση μέσω του προσυναπτικού άλφα-2 ανταγωνισμού, το οποίο την καθιστά μοναδική μεταξύ των διαφόρων αντικαταθλιπτικών. Η σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση εκφράζεται μέσω των 5-HT υποδοχέων. Αυτό γίνεται επειδή η μιρταζαπίνη είναι ένας μετασυναπτικός σεροτονινεργικός 5-HT₂ και 5-HT₃ ανταγωνιστής. Επιπλέον, η μιρταζαπίνη έχει μικρή συγγένεια με τους 5-HT₁ υποδοχείς και έχει πολύ αδύναμες αντιχολινεργικές και ισταμινικές (H₁) ανταγωνιστικές ιδιότητες. Η μικρή αυτή συγγένεια με αυτούς τους κεντρικούς και περιφερικούς υποδοχείς μπορεί να εξηγήσει γιατί εμφανίζει παρόμοιο θεραπευτικό προφίλ με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα ή με τους αναστολείς της σεροτονίνης. Είναι εκλεκτικός ανταγωνιστής των προσυναπτικών α₂ – αυτουποδοχέων και α₂- ετεροϋποδοχέων που ελέγχουν την απελευθέρωση της νορεπινεφρίνης και της σεροτονίνης και εκεί οφείλεται και η δράση της. Κατ' αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η απελευθέρωση της συναπτικής νορεπινεφρίνης [42,43].

Η συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης στο πλάσμα για τη μιρταζαπίνη κυμαίνεται στα 20-300 ng/mL ενώ η συγκέντρωση της στο πλάσμα θεωρείται τοξική όταν το άθροισμά της με το μεταβολίτη της, τη δεσμεθυλομιρταζαπίνη, είναι μεγαλύτερη από 1000 ng/mL [41].

Η μιρταζαπίνη έχει χαμηλή τοξικότητα και ενδείκνυται σε περιπτώσεις ασθενών με μέτρια προς βαριά κατάθλιψη. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί με τη μορφή δισκίων των 30mg ή 45 mg με την εμπορική ονομασία REMERON, αλλά και με τη μορφή γενόσημων φαρμάκων [25].

Η βιοδιαθεσιμότητα της μιρταζαπίνης μετά από του στόματος λήψη κυμαίνεται κοντά στο 50%. Περίπου το 75% μιας δόσης που έχει ληφθεί από το στόμα απεκκρίνεται στα ούρα κυρίως ως προϊόν βιομετατροπής. Η μεταβολική οδός περιλαμβάνει κυρίως N-μεθυλίωση και δευτερευόντως την N-οξειδωση, την υδρόλυση του δακτυλίου και γλυκουρονιδοποίηση [41]. (Σχήμα 3). Εκτός από την αρχική δραστική ουσία, φαρμακολογική δράση εμφανίζει και ο ενεργός μεταβολίτης, δεσμεθυλομιρταζαπίνη. Έχει βρεθεί όμως ότι είναι 3–4 φορές λιγότερο δραστικός σε σχέση με την μιρταζαπίνη [44].



Σχήμα 3: Βιομετατροπή της μιρταζαπίνης

Η μιρταζαπίνη παρουσιάζει ταχεία βελτίωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης, με ελάχιστες αντιχολινεργικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο ανταγωνισμός των 5-HT₃ υποδοχέων βοηθά στην αντιμετώπιση του εμετού που προκαλείται από νευροπαθητικό πόνο και σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη λήψη της μιρταζαπίνης περιλαμβάνουν υπνηλία, ζάλη, διέγερση, υπέρταση και απώλεια της όρεξης [43,45].

Υπερδοσολογία μιρταζαπίνης μπορεί να προκαλέσει αποπροσανατολισμό, υπνηλία και ταχυκαρδία. Μία ηλικιωμένη γυναίκα που έλαβε 900 mg μιρταζαπίνης και 210 mg μιδαζολάμης σε μια προσπάθεια της να αυτοκτονήσει εμφάνισε υπνηλία που διήρκεσε για αρκετές μέρες, αλλά δεν εκδηλώθηκαν σημαντικές μεταβολές στις ζωτικές της λειτουργίες. Σε μια ανάλογη περίπτωση στην οποία ασθενής έλαβε δόση 1200 mg του φαρμάκου, τα επίπεδα της μιρταζαπίνης 41 ώρες μετά τη λήψη της ήταν 386 µg/L. Σε άλλο περιστατικό μια γυναίκα 45

ετών που έλαβε 810 mg του φαρμάκου εμφάνισε μόνο άγχος, σύγχυση και ήπια υπέρταση. Το δείγμα αίματος που συλλέχθηκε έξι ώρες μετά τη λήψη είχε συγκέντρωση 206 µg/L μιρταζαπίνης. Τέσσερα άλλα θύματα οξείας υπεροδοσολογίας που εμφάνισαν πρωτίστως υπνηλία και ταχυκαρδία είχαν συγκέντρωση στον ορρό ή το πλάσμα 140-530 mg/L μιρταζαπίνης. Σε ένα θανατηφόρο περιστατικό ένα νέος άντρας πέθανε από υπερδοσολογία μιρταζαπίνης η οποία είχε μεταθανάτια συγκέντρωση 2.7 mg/L στο αίμα, 2.3 mg/L στο υαλοειδές υγρό και 6.5 mg/L στα ούρα [41].

2.6.3 Σιταλοπράμη

Η σιταλοπράμη (1-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-1-(4-φθοροφαινυλ)-1,3 διυδροϊσοβενζοφουραν-5-καρβονιτρίλιο) είναι ένας εκλεκτικός και ισχυρός αναστολέας επαναπόσληψης της σεροτονίνης που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κατάθλιψης. Προσφέρει παρόμοια θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ευνοϊκότερο προφίλ ανοχής συγκριτικά με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Η σιταλοπράμη έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία όχι μόνο της μείζονος κατάθλιψης αλλά και άλλων διαταραχών της διάθεσης, όπως είναι το άγχος, οι διαταραχές πανικού, οι ιδεοψυχαναγκαστικές διαταραχές και η εξάρτηση από το αλκοόλ ενώ φαίνεται να είναι κατάλληλη για τη θεραπεία του παθολογικού γέλιου και κλάματος. [46]

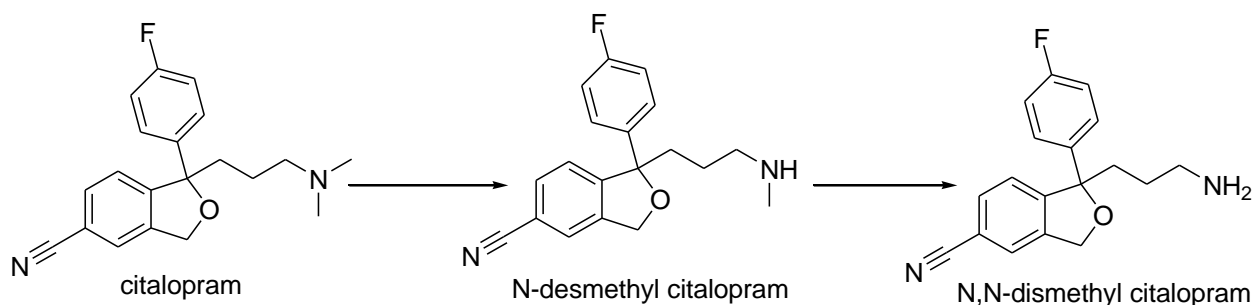
Η σιταλοπράμη χορηγείται συνήθως σε ημερήσιες δόσεις που κυμαίνονται από 20 έως 40 mg (ενώ μέγιστη δόση 60 mg ημερησίως). Η σιταλοπράμη που χορηγείται από το στόμα απορροφάται καλά από το γαστρεντερικό σωλήνα. Ο χρόνος ημιζωής της σιταλοπράμης είναι περίπου 33 ώρες. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί υπό μορφή δισκίων των 20mg με την εμπορική ονομασία SEROPRAM, αλλά και με τη μορφή γενόσημων φαρμάκων [25].

Η συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης στο πλάσμα για τη σιταλοπράμη κυμαίνεται στα 30-200 ng/mL ενώ η συγκέντρωση της στο πλάσμα θεωρείται τοξική όταν είναι μεγαλύτερη από 1000 ng/mL [47].

Η σιταλοπράμη μεταβολίζεται από το σύστημα του ηπατικού κυτοχρώματος P450 (CYP) και εμφανίζονται απομεθυλιωμένοι μεταβολίτες της, όπως η N-δεσμεθυλοσιταλοπράμη (d-CIT) και η N, N, -δεσμεθυλοσιταλοπράμη (dd-CIT) [48] (Σχήμα 4). Οι μεταβολίτες της είναι ρακεμικές ενώσεις με S-(+) και R-(-) εναντιομερή. Το S-(+) εναντιομερές της σιταλοπράμης

είναι φαρμακολογικά δραστικό και σχετίζεται με την αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης, ενώ το R- (-) εναντιομερές της σιταλοπράμης είναι φαρμακολογικά ανενεργό [49].

Οι μεταβολίτες δεν θεωρούνται ότι έχουν κάποιο σχετικό αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα [50], ενώ η αμετάβλητη σιταλοπράμη είναι η κυρίαρχη δραστική ένωση στο ανθρώπινο πλάσμα [51].



Σχήμα 4: Βιομετατροπή της σιταλοπράμης

Στις συνήθειες ανεπιθύμητες ενέργειες από τη λήψη της σιταλοπράμης περιλαμβάνονται ναυτία, εμετός, κεφαλαλγία, εφίδρωση, αϋπνία, ξηροστομία και σεξουαλική δυσλειτουργία[25].

Οξεία υπερδοσολογία με 600mg ή περισσότερα από το φάρμακο μπορεί να προκαλέσει διαταραχές του καρδιογραφήματος ενώ δόσεις πάνω από τα 1900 mg συχνά προκαλούν επιληπτικές κρίσεις. Έχουν αναφερθεί τρία περιστατικά κατά τα οποία οι ασθενείς πέθαναν μετά από οξεία υπερδοσολογία συνδυασμού της σιταλοπράμης με μοκλοβεμίδη (αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης), στα οποία η μεταθανάτια συγκέντρωση της σιταλοπράμης στο αίμα κυμαινόταν μεταξύ 0.3-1.7 mg/L [41].

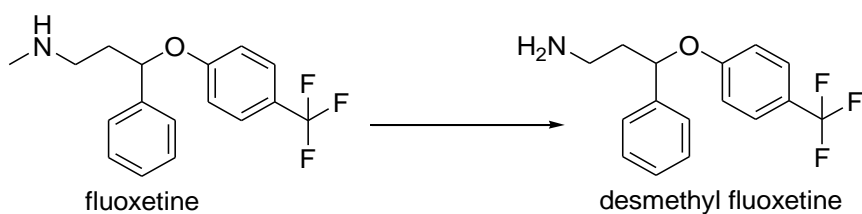
2.6.4 Φλουοξετίνη

Η φλουοξετίνη (3- (p-τριφλουορομεθυλοφαινοξυ) –N-μεθυλο-3-φαινυλοπροπυλαμίνη) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης που υπάρχει ως ρακεμικό μίγμα, με τα εναντιομερή R (-) και S (+) να δείχνουν ισοδύναμη ισχύ ως αναστολείς της πρόσληψης 5-υδροξυτρυπταμίνης (5-HT) τόσο σε δοκιμασίες πρόσληψης in vitro όσο και in vivo [52].

Η φλουοξετίνη ενδείκνυται σε περιπτώσεις κατάθλιψης ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής και ψυχογενούς βουλιμίας. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί με τη μορφή δισκίων ή καψουλών των 20mg αλλά και περισσότερων. Το πρωτότυπο φάρμακο είναι το LADOSE ενώ κυκλοφορούν και αρκετά γενόσημα [25].

Το φάρμακο απορροφάται από το στόμα, με τις θεραπευτικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα να είναι 15-500 ng/mL ενώ οι τοξικές συγκεντρώσεις είναι άνω των 2 μg/mL [41].

Η φλουοξετίνη μεταβολίζεται με N-απομεθυλίωση σε δεσμεθυλοφλουοξετίνη, η οποία είναι ο ενεργός μεταβολίτης της (Σχήμα 5). Η δεσμεθυλοφλουοξετίνη δρα επίσης ως εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης αλλά με μεγαλύτερη ισχύ από την φλουοξετίνη [53]. Αυτός ο δραστικός μεταβολίτης υπάρχει επίσης ως εναντιομερές, αλλά σε αντίθεση με τα εναντιομερή της φλουοξετίνης, η S-δεσμεθυλοφλουοξετίνη είναι πάνω από 20 φορές ισχυρότερη στην αναστολή της πρόσληψης 5-HT από ότι το (R) –εναντιομερές [54].



Σχήμα 5: Βιομετατροπή της φλουοξετίνης

Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι της φλουοξετίνης δείχνουν ότι απορροφάται αποτελεσματικά από τη γαστρεντερική οδό αρουραίου μετά από χορήγηση από το στόμα. Υπόκειται σε ηπατικό μεταβολισμό πρώτης διόδου και η βιοδιαθεσιμότητα της μετά από το στόμα χορήγηση είναι <90% [55]. Η φλουοξετίνη έχει υψηλό λιπόφιλο χαρακτήρα και φαίνεται να δεσμεύεται έντονα με πρωτεΐνες πλάσματος. Έτσι, οι υψηλές συγκεντρώσεις της φλουοξετίνης και του μεταβολίτη της δεσμεθυλοφλουοξετίνης φτάνουν στον εγκέφαλο [56]. Επιπλέον, και οι δύο ενώσεις αναστέλλουν τα ισοένζυμα CYP2D6 *in vitro* και *in vivo*. Τα (S) -εναντιομερή της φλουοξετίνης και της δεσμεθυλοφλουοξετίνης είναι έξι φορές πιο ισχυρά από τα αντίστοιχα (R) -εναντιομερή και επομένως αμφότερες οι ενώσεις μπορούν να ανταγωνιστούν με άλλα φάρμακα για το μεταβολισμό τους από το CYP2D6.

Η φλουοξετίνη και η δεσμεθυλοφλουοξετίνη έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής. Σύμφωνα με μελέτες ο χρόνος ημιζωής για την αποβολή του φαρμάκου από το πλάσμα στους ανθρώπους είναι 1-3 ημέρες για τη φλουοξετίνη και 7-15 ημέρες για τη δεσμεθυλοφλουοξετίνη. Αυτός ο μεγάλος χρόνος ημιζωής θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα πλεονέκτημα για τη φλουοξετίνη επειδή αποφεύγεται η πρόκληση συνδρόμου στέρησης όταν είναι απαραίτητο να γίνει αλλαγή στο φάρμακο [57].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνονται η βίαιη συμπεριφορά, η ναυτία, ο εμετός, η διάρροια, η ανορεξία σε συνδυασμό με την απώλεια βάρους. Επιπλέον περιλαμβάνονται ξηροστομία, ιδρώτα, σπασμούς, αϋπνία κ.α. Πολλές φορές λόγω του μεγάλου χρόνου ημιζωής τόσο του φαρμάκου όσο και του μεταβολίτη παρατηρούνται καθυστερημένες αντιδράσεις. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η φλουοξετίνη αναστέλλει το CYP2D6 και αλληλεπιδρά με άλλα φάρμακα. Η χρήση της αντενδείκνυται σε περιπτώσεις συγχορήγησης με αναστολείς ΜΑΟ λόγω των σοβαρών αλληλεπιδράσεων [25].

Σε οξεία υπερδοσολογία με άνω των 1500 mg φλουοξετίνης έχουν παρατηρηθεί συχνά συμπτώματα όπως λήθαργος, ταχυκαρδία και υπέρταση. Ένα κορίτσι το οποίο επιβίωσε έπειτα από λήψη άγνωστης ποσότητας του φαρμάκου ανέπτυξε κρίσεις επιληψίας ενώ τα επίπεδα της φλουοξετίνης και της δεσμεθυλοφλουοξετίνης στον ορό ήταν 2.0 mg/L και 0.4 mg/L αντίστοιχα. Σε μία περίπτωση θανάτου βρέθηκε πως τα επίπεδα της φλουοξετίνης στο περιφερικό αίμα ήταν πάνω από 0.6 mg/L και κρίθηκε πως η υψηλή αυτή συγκέντρωση ήταν ένας παράγοντας που συνέβαλλε στο θάνατο. Έξι θάνατοι έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους οι οποίοι έλαβαν 1-2 g φλουοξετίνης και, σε τέσσερις από αυτές, υπήρχε τουλάχιστον ένα ακόμα φάρμακο (κωδεΐνη, μεπεριδίνη, κλοζαπίνη ή διφαινυδραμίνη). Η φλουοξετίνη υπόκειται σε μεταθανάτια ανακατανομή. Οι λόγοι συγκεντρώσεων στο καρδιακό προς μηριαίο αίμα ήταν 3.5 και 4.5 αντίστοιχα σε δυο περιπτώσεις θανατηφόρας δόσης. Σε ένα άλλο σύνολο πέντε θανάτων οι λόγοι των συγκεντρώσεων στο καρδιακό και μηριαίο αίμα ήταν κατά μέσο όρο 2,9 για τη φλουοξετίνη και 4.4 για τη δεσμεθυλοφλουοξετίνη αντίστοιχα [41].

2.6.5 Αμιτριπτυλίνη

Η αμιτριπτυλίνη {N},-{N}-διμεθυλο-3-(2-τρικυκλο[9.4.0.0]^{3,8}] πενταδεκα-1(15)3,5,7,11,13-εξαενυλιδενο) προπαν-1-αμίνη είναι ένα τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό το οποίο πιστεύεται ότι έχει παράλληλα αναλγητικές αλλά και αντιφλεγμονώδης ιδιότητες λόγω της μείωσης της παραγωγής της προσταγλανδίνης [58].

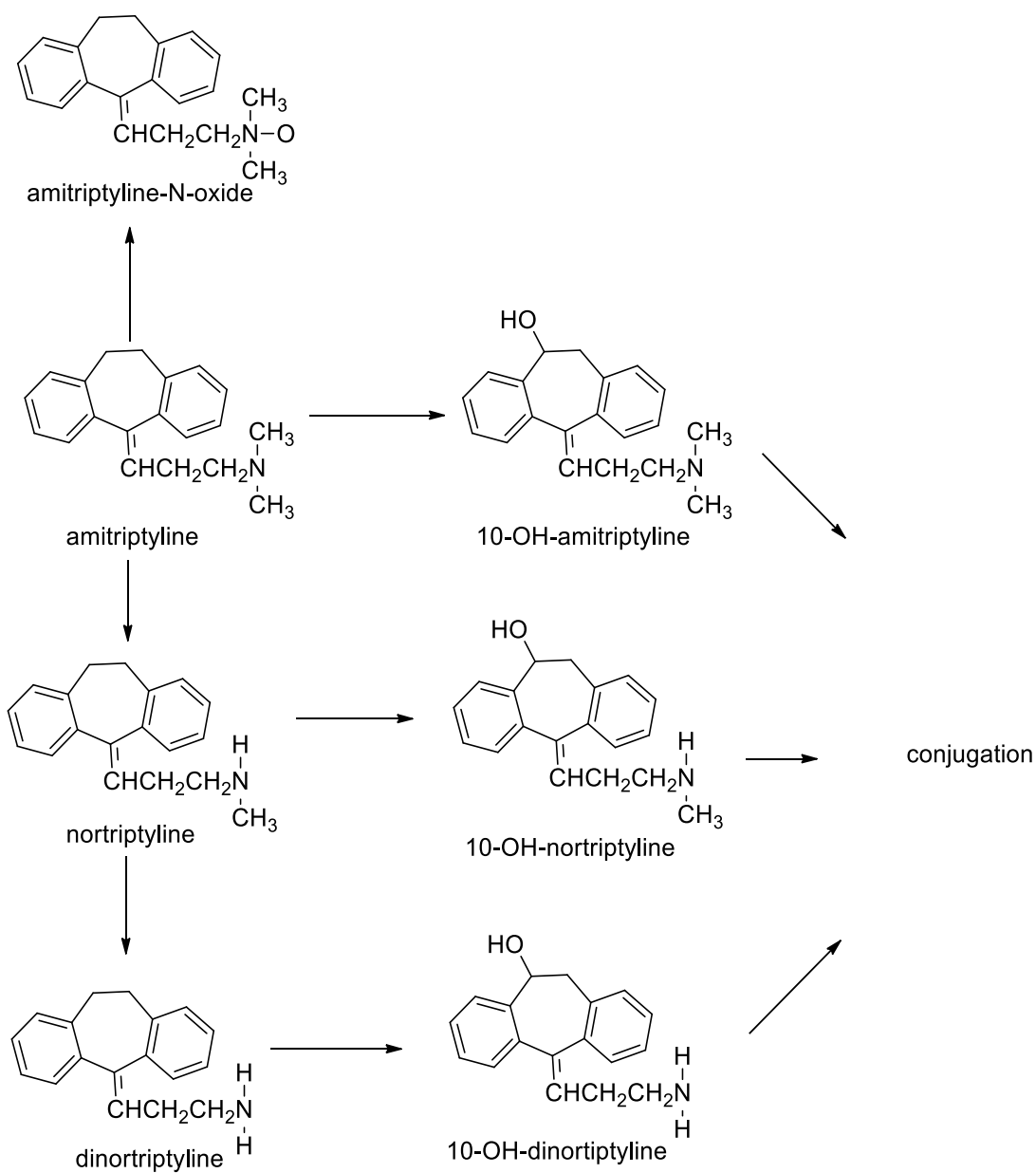
Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί υπό μορφή καψουλών των 25mg και των 75mg καθώς και με τη μορφή δισκίων των 10 mg και των 25 mg με την εμπορική ονομασία SAROTEN [25].

Το φάρμακο απορροφάται ευχερώς από το στόμα, με τις θεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα να είναι 38-300 ng/mL, ενώ ως τοξικές συγκεντρώσεις θεωρούνται όταν

το άθροισμα της συγκέντρωσης της ουσίας μαζί με το μεταβολίτη της, νοτριπτυλίνη, είναι άνω των 500 ng/mL [41].

Η αμιτριπτυλίνη είναι ένα ιδιαίτερα λιπόφιλο φάρμακο που υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό[14]. Έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα (47 ± 11 %) μετά από του στόματος χορήγηση λόγω του μεταβολισμού πρώτης διόδου [59,60]. Ο ζωής ημιζωής της αμιτριπτυλίνης κυμαίνεται από 15 έως 19 ώρες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση [61] και 17 έως 26 ώρες μετά από λήψη από το στόμα [62]. Η αμιτριπτυλίνη μεταβολίζεται εκτεταμένα, κυρίως με N-απομεθυλίωση, μέσω της οποίας σχηματίζεται ο ενεργός μεταβολίτης της η νοτριπτυλίνη, ενώ μεταβολίζεται σε μικρότερη έκταση με αντιδράσεις υδροξυλίωσης και N-οξειδωσης [63] (Σχήμα 6). Η μετατροπή της αμιτριπτυλίνης σε νοτριπτυλίνη παρουσιάζει σημαντική διατομική διακύμανση [64]. Διάφορα κυτοχρώματα εμπλέκονται στο μεταβολισμό της αμιτριπτυλίνης: Το CYP2D6 καταλύει την υδροξυλίωση της αμιτριπτυλίνης και νοτριπτυλίνης, ενώ τα CYP2C19 και CYP3A4 εμπλέκονται στην απομεθυλίωση της αμιτριπτυλίνης προς νοτριπτυλίνη [65].

Ένας άλλος σημαντικός μεταβολίτης της αμιτριπτυλίνης που είναι πιθανώς ενεργός είναι η δινοτριπτυλίνη που βρίσκεται σε ορισμένο βαθμό στο πλάσμα. Υπάρχουν τρεις υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες της αμιτριπτυλίνης, η 10-OH-αμιτριπτυλίνη, η 10-ύδροξυνοτριπτυλίνη και η 10-ύδροξυδινοτριπτυλίνη, οι οποίοι έχουν βρεθεί στο αίμα αλλά πιθανότατα δεν έχουν καμία συνεισφορά στη δράση του φαρμάκου.[41]



Σχήμα 6: Βιομετατροπή της αμιτριπτυλίνης

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες της αμιτριπτυλίνης περιλαμβάνονται ταχυκαρδία, αρρυθμία και κυκλοφορική υπόταση. Επιπλέον παρατηρείται ξηρότητα του στόματος, εφίδρωση και υπνηλία ενώ υπάρχουν περιπτώσεις υπερευαισθησίας στο πεπτικό σύστημα καθώς και διαταραχές του σακχάρου αλλά και του σωματικού βάρους [25].

Η αμιτριπτυλίνη έχει βρεθεί πως μπορεί να μην είναι αποτελεσματική όταν χορηγείται σε συνδυασμό με αλκοόλ. Η υπερδοσολογία με αμιτριπτυλίνη αποτελεί μία σοβαρή δηλητηρίαση,

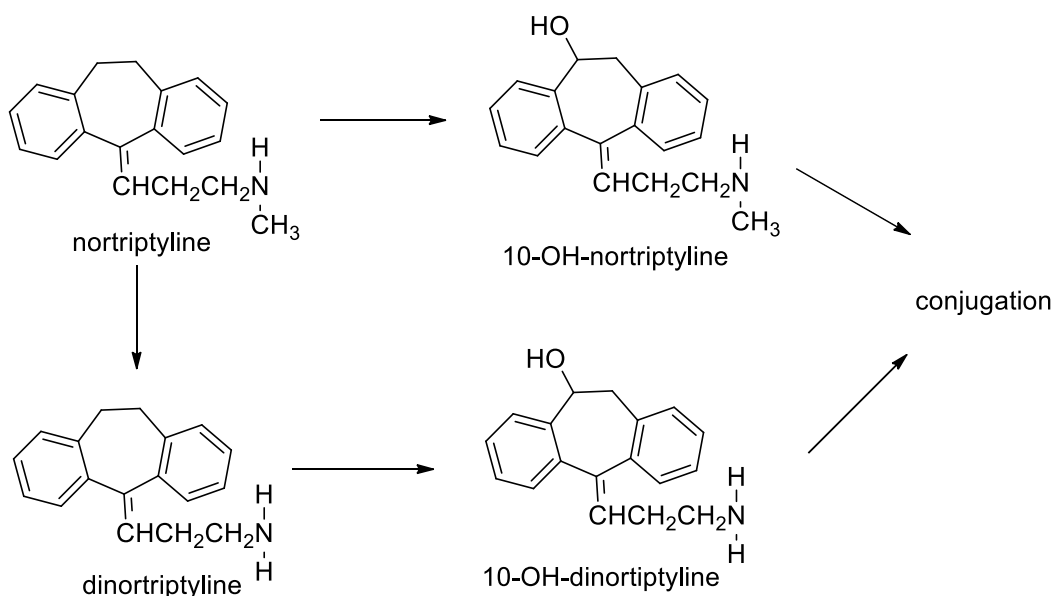
και είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί. Συγκεντρώσεις στο πλάσμα άνω των 2mg/L έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς που επέζησαν, οι οποίοι είχαν λάβει έως 2000 mg αμιτριπυλίνης παρουσιάζοντας κόμμα, κρίσεις επιληψίας και καρδιακές ανωμαλίες. Η φυστοστιγμίνη, ένα χολινεργικό φάρμακο, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη διάγνωση και τη θεραπεία της δηλητηρίασης με αμιτριπυλίνη αλλά και άλλα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Έχουν υπάρξει πολλά περιστατικά στα οποία έγινε λήψη τουλάχιστον 600 mg του φαρμάκου. Σε μερικά μάλιστα όπου η λήψη του φαρμάκου ήταν 3-5 g, οι συγκεντρώσεις της αμιτριπυλίνης στο αίμα ήταν κατά μέσο όρο 9 mg/L (από 3 έως 15 mg/L) [41].

2.6.6 Νορτριπυλίνη

Η νορτριπυλίνη ({N}-μεθυλ-3-(2-τρικυκλο[9.4.0.0] {3,8}) πενταδεκα-1(15), 3,5,7,11,13-εξαενυλιδενο) προπαν-1-αμίνη) είναι ένα τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό που παρουσιάζει ανώτερες φαρμακολογικές ιδιότητες, σε σύγκριση με άλλα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, ως ψυχοτρόπος παράγοντας, με χαμηλότερη τοξικότητα [66]. Γενικά η νορτριπυλίνη παρατηρείται στο αίμα σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 0.200 mg/L. Χορηγείται από το στόμα σε δόσεις των 25 mg 3 ή 4 φορές ημερησίως. Η συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης της νορτριπυλίνης στο πλάσμα βρίσκεται εντός της βέλτιστης περιοχής από 50 έως 150 ng/mL [67].

Η συμμετοχή του CYP3A4 στο μεταβολισμό της νορτριπυλίνης φαίνεται πιθανή, λαμβάνοντας υπόψη είτε περιπτώσεις αναφορών αύξησης του μεταβολισμού της νορτριπυλίνης με ταυτόχρονη χρήση επαγωγέων του CYP3A4, όπως η πεντοβαρβιτάλη, η καρβαμαζεπίνη, και η ριφαμπαμίνη [68-70], είτε αναφορές σε παρεμπόδιση νορτριπυλίνης από τους αναστολείς του CYP3A4, όπως η φλουκοναζόλη και η σιμετιδίνη [71,72].

Η νορτριπυλίνη μεταβολίζεται με αντιδράσεις N-απομεθυλίωσης και 10-υδροξυλίωσης καθώς και σύζευξης του γλυκουρονιδίου των δύο υδροξυ-παραγώγων. Κανένας από αυτούς τους μεταβολίτες δεν δείχνει να συσσωρεύεται σε υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα. Η βιομετατροπή της νορτριπυλίνης στους μεταβολίτες φαίνεται στο Σχήμα 7 [41].



Σχήμα 7: Βιομετατροπή της νορτριπτυλίνης

Η νορτριπτυλίνη είναι ένας ασθενής αναστολέας του CYP2D6 που προκαλεί λιγότερα προβλήματα σε σχέση με τα άλλα φάρμακα της κατηγορίας των τρικυκλικών όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα. Ωστόσο, ορισμένες κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ νορτριπτυλίνης και άλλων φαρμάκων έχουν περιγραφεί. Συγχορήγηση με άλλα φάρμακα που αναστέλλουν το CYP2D6, όπως η τερβιναφίνη, η φλουοξετίνη, η δεσμεθλοφλουοξετίνη, η σεραραλίνη και η παροξετίνη, έχει ως αποτέλεσμα να μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις της νορτριπτυλίνης στο πλάσμα, ενώ ο όγκος κατανομής παραμένει αμετάβλητος [73-75]. Από την άλλη πλευρά, οι συγκεντρώσεις πλάσματος ορισμένων ναρκωτικών επηρεάζονται από τη συγχορήγηση με νορτριπτυλίνη, όπως συμβαίνει και με τη περίπτωση της χλωπρομαζίνης, η οποία δείχνει μειωμένη απέκκριση και αυξημένες συγκεντρώσεις στο πλάσμα παρουσία νορτριπτυλίνης [76].

Ανεπιθύμητες παρενέργειες που έχουν αναφερθεί μετά από λήψη της ουσίας είναι η υπόταση, η υπέρταση, ταχυκαρδία, καρδιακές αρρυθμίες, σύγχυση, άγχος, ξηροστομία, ναυτία και θολή όραση. Μία αλλαγή στη φαρμακοτεχνική μορφή του φαρμάκου σε έναν άντρα που λάμβανε σταθερά 175 mg/ημερησίως νορτριπτυλίνης προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα στο πλάσμα από 0.125 mg/L στα 0.600 mg/L. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κεφαλαλγίας, λήθαργου και σύγχυσης. Προσθήκη τερμπιναφίνης στη φαρμακευτική αγωγή ενός ενήλικα που λάμβανε νορτριπτυλίνη προκάλεσε διπλασιασμό των επιπέδων της νορτριπτυλίνης στον ορό και

είχε ως αποτέλεσμα τη φαρμακευτική δηλητηρίαση. Ηπατική ανεπάρκεια προκλήθηκε σε μια γυναίκα που βρισκόταν σε χρόνια θεραπεία με νοτριπτυλίνη με αποτέλεσμα την τοξική συσσώρευση του φαρμάκου με το χρόνο ημιζωής να είναι 14 ημέρες.

Λίγες περιπτώσεις σοβαρής δηλητηρίασης, θανατηφόρες ή μη, που να οφείλονται στη νοτριπτυλίνη έχουν αναφερθεί σε σχέση με τα υπόλοιπα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί περίπτωση επιβίωσης ατόμου που έλαβε 2500 mg του φαρμάκου, μετά την οποία η συγκέντρωση στο πλάσμα ήταν 0.5-0.9 mg/L. Σε μια άλλη υπόθεση, μια έγκυος γυναίκα έλαβε τουλάχιστον 1500 mg νοτριπτυλίνης και βρέθηκε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα 1.2 mg/L 17 ώρες αργότερα, όπου κατά το χρονικό αυτό διάστημα βρισκόταν λιπόθυμη. Η γυναίκα ανέκτησε τις αισθήσεις της μετά τη γέννηση του παιδιού, όταν τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα έπεσαν στα 0.9 mg/L, 36 ώρες μετά τη λήψη του. Σε άλλη περίπτωση μια γυναίκα που έλαβε 2000 mg νοτριπτυλίνης πήγε σε νοσοκομείο 12 ώρες αργότερα ξύπνια αλλά χωρίς αίσθηση του προσανατολισμού, ενώ τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα ήταν 0.886 mg/L ενώ ακολούθως έπεσε σε κώμα και τελικά κατέληξε πέντε ώρες αργότερα [41].

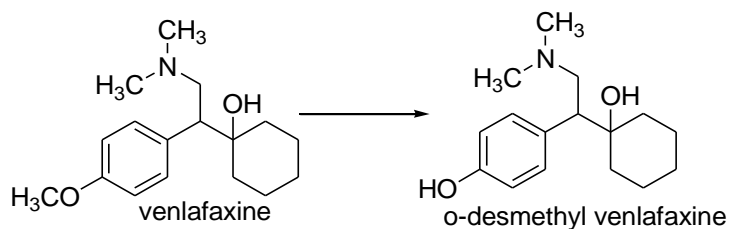
2.6.7 Βενλαφαξίνη

Η βενλαφαξίνη ή 1-[2-(Διμεθυλάμινο)-1-(4-μεθόξυφαινυλ)αιθυλ] κυκλοεξανόλη είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης και ασθενής αναστολέας επαναπρόσληψης της νορεπινεφρίνης. Χρησιμοποιείται στη θεραπεία και την πρόληψη της σοβαρής κατάθλιψης, καθώς και στη θεραπεία γενικευμένης διαταραχής άγχους, κοινωνικής διαταραχής άγχους, διαταραχής πανικού και στην αγοραφοβία. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί σε μορφή χαπιού των 37,5mg, 50mg, 75mg και 150mg με την εμπορική ονομασία EFEXOR ή άλλων γενόσημων φαρμάκων [25].

Το φάρμακο απορροφάται αργά μετά την από του στόματος χορήγηση, με την συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης στο πλάσμα να κυμαίνεται μεταξύ 250-750 ng/mL ενώ όταν το άθροισμα των συγκεντρώσεων της ουσίας με το μεταβολίτη της δεσμεθυλοβενλαφαξίνη είναι άνω των 1000 ng/mL θεωρείται τοξική [77].

Η βενλαφαξίνη είναι ένα αντικαταθλιπτικό φάρμακο το οποίο υπόκειται σε εκτεταμένη βιομετατροπή στο ήπαρ. Ο κύριος μεταβολίτης της, η δεσμεθυλοβενλαφαξίνη, έχει φαρμακολογική δράση παρόμοια με αυτή της βενλαφαξίνης (Σχήμα 8) Παρόλα αυτά ο

μεταβολίτης έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και συγκεκριμένα είναι 10 ώρες έναντι 4 ωρών της βενλαφαζίνης [78].



Σχήμα 8: Βιομετατροπή της βενλαφαζίνης

Η αναστολή της επαναπρόσληψης τόσο της σεροτονίνης όσο και της νορεπινεφρίνης πιστεύεται ότι είναι σημαντική για την αντικαταθλιπτική δράση της βενλαφαζίνης. Είναι πιθανό ότι παρόμοιοι μηχανισμοί υποδεικνύουν οποιαδήποτε αναλγητική δράση της βενλαφαζίνης, καθώς τόσο η νορεπινεφρίνη όσο και η σεροτονίνη είναι πρωτεύοντες νευροδιαβιβαστές στις ανασταλτικές κατιοντικές οδούς πόνου του συντονιστή του τόπου και του πυρήνα Raphe, αντίστοιχα. Ωστόσο, λείπουν οι άμεσες ενδείξεις του μηχανισμού δράσης της βενλαφαζίνης στη θεραπεία του νευροπαθητικού πόνου [79].

Μερικές από τις ανεπιθύμητες ενέργειες της βενλαφαζίνης περιλαμβάνουν κεφαλαλγία, υπνηλία, ζάλη, τρόμο και παραισθήσεις. Επίσης παρατηρούνται οπτικές διαταραχές, αντιδράσεις υπερευαισθησίας και εφίδρωση. Τέλος σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη αρτηριακή πίεση [25].

Σε υπερδοσολογία βενλαφαζίνης μπορεί να προκληθεί υπέρταση, υπόταση, επιληπτικές κρίσεις, έμετος και καρδιακή αρρυθμία. Έξι ενήλικες έχουν επιζήσει μετά από οξεία κατάποση 3.2-8.9 g βενλαφαζίνης. Οι ασθενείς αυτοί είχαν υπεισέρθει σε κώμα, ή είχαν εμφανίσει υπόταση και επιληπτικές κρίσεις. Οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα μετρήθηκαν 6,1-16mg/L για τη βενλαφαζίνη και 1.0-5.1 mg/L για τη δεσμεθυλοβενλαφαζίνη. Σε 5 περιπτώσεις θανάτου η μέση συγκέντρωση βενλαφαζίνης στο μηριαίο αίμα ήταν 41 mg/L. Σε 10 άλλες περιπτώσεις αυτοκτονιών η συγκέντρωση της βενλαφαζίνης στο αίμα ήταν 56 mg/L (από 6.6 έως 89 mg/L) [41].

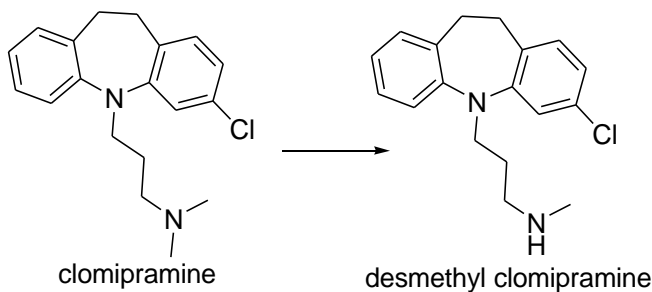
2.6.8 Κλομιπραμίνη

Η κλομιπραμίνη ή 3-χλωρο-10,11-διϋδρο-N, N-διμεθυλ-5H-διβενζ [b, f] αζεπινο-5-προπαναμίνη είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης [80]. Η κλομιπραμίνη χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις κατάθλιψης, διαταραχές πανικού, ιδεοψυχαναγκαστικές διαταραχές και φοβικές διαταραχές. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί υπό μορφή δισκίων των 10 mg, 25mg και 75mg με την εμπορική ονομασία ANAFRANIL [25].

Η κλομιπραμίνη χορηγείται κυρίως από το στόμα αλλά και ενδοφλεβίως με τη θεραπευτική συγκέντρωση στο πλάσμα να κυμαίνεται 17-330ng/mL ενώ η τοξική συγκέντρωση της στο πλάσμα είναι άνω των 600 ng/mL [81,82]. Ο χρόνος ημιζωής της κλομιπραμίνης εκτιμάται σε 20.4 ώρες. Το φάρμακο απορροφάται εύκολα από τη γαστρεντερική οδό. Η κλομιπραμίνη υπόκειται σε βιομετατροπή μέσω απομεθυλίωσης στο ήπαρ στον κύριο μεταβολίτη της, τη δεσμεθυλοκλομιπραμίνη (Σχήμα 9). Οι μετέπειτα μεταβολικές οδοί τόσο της κλομιπραμίνης όσο και της δεσμεθυλοκλομιπραμίνης περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης και N-οξείδωσης [81,83].

Η δεσμεθυλ-κλομιπραμίνη, ένας ενεργός ηπατικός μεταβολίτης, εμφανίζει ως επί το πλείστον νοραδρενεργική δράση και έχει αναγνωριστεί ως υπεύθυνη για την πλειονότητα των παρενεργειών της κλομιπραμίνης [84].

Η απομεθυλίωση της κλομιπραμίνης σχετίζεται με τις θεραπευτικές της επιδράσεις, επειδή αυτή και ο μεταβολίτης της δεσμεθυλοκλομιπραμίνη έχουν διαφορετικά προφίλ όσον αφορά τη δράση τους στην αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Η κλομιπραμίνη δρα στο σύστημα της σεροτονίνης, ενώ η δεσμεθυλοκλομιπραμίνη έχει πιο έντονη δράση στο νοραδρενεργικό σύστημα [85].



Σχήμα 9: Βιομετατροπή της κλομιπραμίνης.

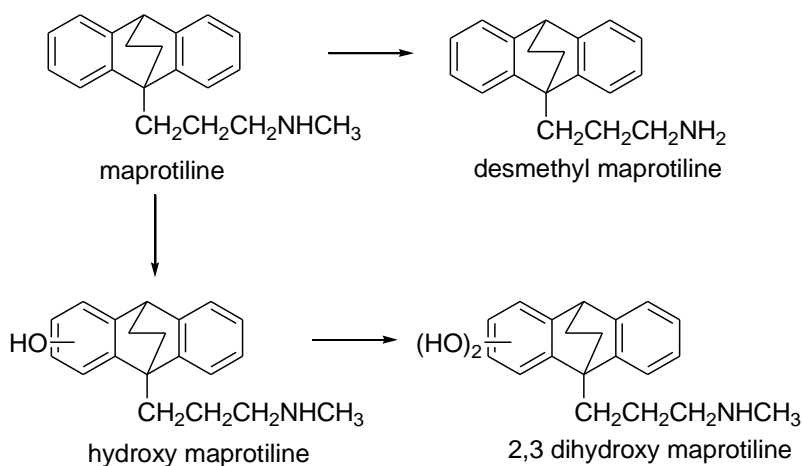
Η κλομιπραμίνη σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας προκαλεί καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος, διέγερση, σπασμούς, υποτονία, υπερπυρεξία και καρδιακή αρρυθμία. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί περιστατικά δηλητηριάσεων από κλομιπραμίνη. Δύο ενήλικες επέζησαν μετά από οξεία κατάποση 15 g κλομιπραμίνης και εισήλθαν σε κόμα, ενώ στη μία περίπτωση προκλήθηκε παραλυτικός ειλεός και παγκρεατίτιδα. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της κλομιπραμίνης ήταν της τάξης των 0.75-2.84 mg/L και της δεσμεθυλ-κλομιπραμίνης 0,61-1,54 mg/L. Υπήρξαν 5 θανατηφόρες περιπτώσεις στις οποίες τα μεταθανάτια επίπεδα στο αίμα της κλομιπραμίνης ήταν 0.54-3.3 mg/L και της δεσμεθυλ-κλομιπραμίνης ήταν 0.58-1.54 mg/L [41].

2.6.9 Μαπροτιλίνη

Η μαπροτιλίνη ή 9-(γ-μεθυλαμινο-προπυλο)-9,10-διϋδρο-9,10-αιθανοανθρακένιο είναι μια άτυπη αντικαταθλιπτική ένωση, η οποία χαρακτηρίζεται από την τετρακυκλική δομή της και την πλευρική αλυσίδα της δευτεροταγούς αμίνης. Έχει μέτριες επιδράσεις στους β-νοραδρενεργικούς, μουσκαρινικούς καθώς και ισταμινικούς υποδοχείς [86-88].

Η μαπροτιλίνη ενδείκνυται σε περιπτώσεις κατάθλιψης ιδιαίτερα με άγχος ή με ψυχοκινητική ανησυχία, αλλά δεν χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο λόγω της εμφάνισης πιο αποτελεσματικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, όπως οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Στον Ελλαδικό χώρο κυκλοφορεί με τη μορφή δισκίων των 25 mg, των 50 mg και των 75 mg με την εμπορική ονομασία LUDIOMIL. Η χορήγηση της γίνεται αρχικά με 50-75 mg/ημερησίως στους ενήλικες, ενώ σε νεαρά και ηλικιωμένα άτομα η δόση αυτή είναι 25-50 mg. Η δόση αυξάνεται προοδευτικά έως το μέγιστο των 150-200 mg/ημερησίως.

Η απορρόφησή της γίνεται αργά από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης στο πλάσμα επιτυγχάνεται μετά το πέρας 7 ημερών από τη λήψη από το στόμα και κυμαίνεται μεταξύ 168-718 ng/mL. Οι μεταβολίτες είναι κυρίως προϊόντα N-απομεθυλίωσης μέσω του CYP2D6, απαμίνωσης, υδροξυλίωσης και σύζευξης (Σχήμα 10) [41].



Σχήμα 10: Βιομετατροπή της μαπροτιλίνης.

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες της μαπροτιλίνης περιλαμβάνονται η ταχυκαρδία και η αρρυθμία. Επιπλέον παρατηρείται ξηρότητα του στόματος, εφίδρωση και υπνηλία ενώ υπάρχουν περιπτώσεις υπερευαισθησίας στο πεπτικό σύστημα καθώς και διαταραχές του σακχάρου αλλά και του σωματικού βάρους. Η κατασταλτική δράση της μαπροτιλίνης είναι ισχυρότερη σε σύγκριση με την αμιτριπτυλίνη και εμφανίζει μεγαλύτερη πιθανότητα πρόκλησης σπασμών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντικαταθλιπτικά [25].

Έχουν υπάρξει αρκετοί ασθενείς που έχουν λάβει μαπροτιλίνη σε θεραπευτικά επίπεδα και έχουν παρουσιάσει κρίσεις επιληψίας όταν η συγκέντρωση στον ορό ήταν 0,237-0,317 mg/L. Τέσσερις ενήλικες επέζησαν από υπερβολική δόση μαπροτιλίνης με τη μέγιστη συγκέντρωση μαπροτιλίνης στο πλάσμα να είναι 0.401-0.800 mg/L. Σε περιπτώσεις εννέα θανάτων ενηλίκων από θανατηφόρο δόση παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις 1.3-13 mg/L στο αίμα και 4-25 mg/L στα ούρα. Επιπλέον η ομάδα των Rejent και Doyle περιέγραψαν ένα περαστικό θάνατο από υπερβολική δόση μαπροτιλίνης με τα μεταθανάτια επίπεδα της να είναι 45 mg/L στο αίμα και 605 mg/kg στο ήπαρ. Η μαπροτιλίνη παρουσιάζει υψηλή μεταθανάτια ανακατανομή. Οι λόγοι των συγκεντρώσεων στο καρδιακό προς το μηριαίο αίμα έχουν βρεθεί 1.4-11 με μέσο όρο 4.7 σε τρία θύματα που πέθαναν από υπερβολική δόση μαπροτιλίνης [41].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

3.1 Τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων και απομόνωσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων

Τα βιολογικά υλικά που κατά κύριο λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους είναι το ολικό αίμα [89,90], το πλάσμα [89,91], το υαλοειδές υγρό [90,92] τα ούρα [90,91], διάφοροι ιστοί [90,93], ο ορός [89], οι ξηραμένες κηλίδες αίματος επί χάρτου (dried blood spots, DBS) [97] κλπ.

Το αίμα είναι το βιολογικό υλικό το οποίο προτιμάται για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων λόγω της εύκολης δειγματοληψίας του. Σε αυτό εντοπίζονται τόσο τα φάρμακα όσο και οι κύριοι μεταβολίτες τους. Επιπλέον η συγκέντρωση ενός φαρμάκου, ή γενικότερα μίας ουσίας, στο αίμα σχετίζεται άμεσα με την κλινική εικόνα του ατόμου.

Πριν την εφαρμογή των χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης απαιτείται η απομόνωση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων από τα υπόλοιπα συστατικά του βιολογικού δείγματος. Τεχνικές απομόνωσης των φαρμάκων από το εκάστοτε βιολογικό υλικό που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί και περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι:

1. η υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE) [90,91,92] και
2. η εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE) [89,93],

Το στάδιο της εκχύλισης και απομόνωσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη ή του συστήματος διαλυτών εκχύλισης και η παραλαβή των αναλυτών με κάποιον άλλο συνήθως οργανικό διαλύτη. Ο διαλύτης παραλαβής και έγχυσης στο αναλυτικό όργανο επιλέγεται βάσει της διαλυτότητας των υπό εξέταση αναλυτών σε αυτόν και ποικίλει ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους.

3.1.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση

Η υγρό-υγρό εκχύλιση αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης αναλυτών από βιολογικά υλικά, όπως αίμα, πλάσμα, ορό και ούρα, που προηγείται της χρωματογραφικής ανάλυσης. Μετά την αρχική ρύθμιση του pH των δειγμάτων και την υδρόλυση ή αραίωση των δειγμάτων ούρων, η εκχύλιση των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών πραγματοποιείται με διάφορους διαλύτες, όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 1 και 2. Οι διαλύτες ή τα μίγματα διαλυτών που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί σε δημοσιευμένες εργασίες για την υγρό-υγρό εκχύλιση για την απομόνωση των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι ο tert-βουτυλ-μέθυλ-αιθέρας (TBME) [93], το τολουόλιο [94], το τετράχλωρο αιθάνιο [95], μίγμα τριαιθυλαμίνης: βουτυλοχλωριδίου [97], μίγμα επτανίου : ισοάμυλο-αλκοόλης (99:1) [98], ο οξικός αιθυλεστέρας [92] ή άλλα μίγματα οργανικών διαλυτών σε διάφορες αναλογίες.

3.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης

Η εκχύλιση στερεής φάσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την απομόνωση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους από τα διάφορα βιολογικά υλικά (αίμα, πλάσμα, ούρα, υαλοειδές υγρό κλπ.) (Πίνακες 1 και 2). Η εκχύλιση στερεής φάσης πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων στηλών διαφόρων τύπων, η επιλογή των οποίων γίνεται ανάλογα με τη χημική συμπεριφορά των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Για την απομόνωση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, έχουν χρησιμοποιηθεί στήλες εκχύλισης μη πολική φάσης (μη πολικές και ισχυρής ιοντικής δράσης) (Πίνακες 1 και 2).

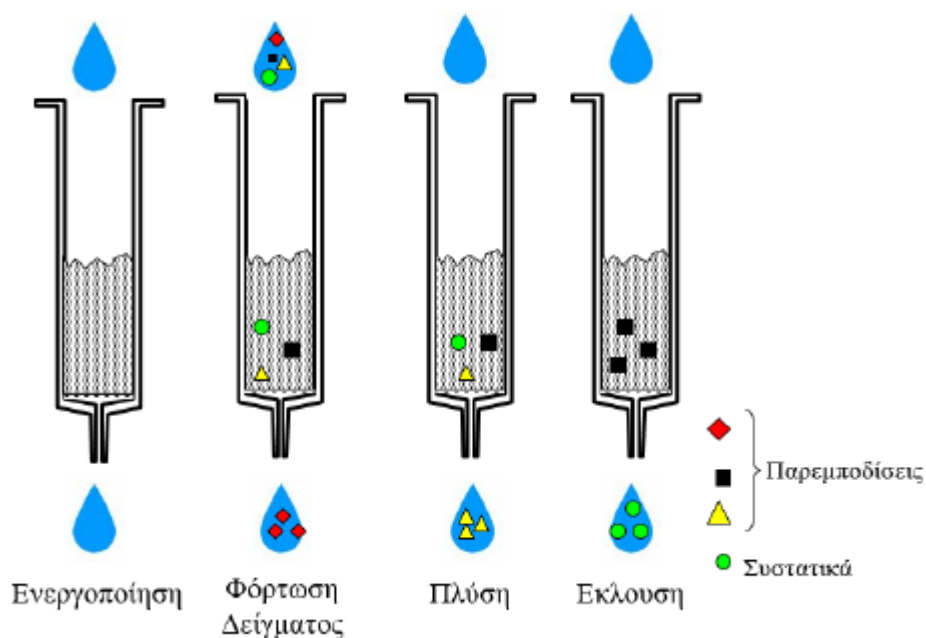
Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεής φάσης είναι:

- ❖ Απαιτείται σχετικά μικρός χρόνος εκτέλεσης
- ❖ Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών
- ❖ Ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος
- ❖ Καλή επαναληψιμότητα και αυξημένη ευαισθησία

Η διαδικασία της εκχύλισης στερεής φάσης περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης, η οποία συνήθως πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με διαδοχική εφαρμογή μεθανόλης και συνέχεια νερού ή/και ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου pH που έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του βιολογικού δείγματος. Ακολουθεί η εφαρμογή του βιολογικού δείγματος στη

στήλη και έπεται ο καθαρισμός με διαδοχικές πλύσεις με νερό ή/και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι πλύσεις ολοκληρώνονται με την εφαρμογή κατάλληλου πολικού οργανικού διαλύτη. Τέλος, πραγματοποιείται η έκλυση των προσδιοριζόμενων αναλυτών, συνήθως, με πολικούς διαλύτες ή μίγματα αυτών. (Σχήμα 11) [100]. Στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποια στοιχεία από μελέτες όπου χρησιμοποιείται η εκχύλιση στερεής φάσης για την απομόνωση κάποιων από τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα και των μεταβολιτών τους από διάφορα βιολογικά υλικά. Κυριότερες στήλες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης για την ανάλυση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι οι Bond Elut LRC Certify [108,109], οι Isolute C₈ [115] και οι Oasis HLB [105].

Στη βιβλιογραφία περιγράφεται, ακόμη, και η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (solid-phase microextraction, SPME) μέσω ανάλυσης της υπερκείμενης φάσης, η οποία έχει εφαρμοσθεί για την απομόνωση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Πριν την εφαρμογή μεθόδων εκχύλισης αυτού του τύπου, πρέπει να εξετάζεται η θερμική σταθερότητα του εκάστοτε αναλύτη, προκειμένου να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του μορίου και η κακή επαναληψιμότητα [101].



Σχήμα 11: Στάδια και τρόποι εφαρμογής της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE).

3.2 Χρωματογραφικές αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά

Ένα πλήθος μεθόδων για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά έχουν δημοσιευθεί. Οι αναλυτικές τεχνικές που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) (Πίνακας 5) και η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) σε διάφορους ανιχνευτές (Πίνακας 6). Ο συνδυασμός αέριας και υγρής χρωματογραφίας με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) αποτελεί σημαντική εναλλακτική λύση στα αναλυτικά προβλήματα των τοξικολογικών εργαστηρίων τα τελευταία χρόνια. Οι μέθοδοι οι οποίες έχουν αναπτυχθεί με τη χρήση αυτής της οργανολογίας διαθέτουν υψηλή ειδικότητα και πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Εντούτοις, απαιτείται υψηλό κόστος για την αγορά και τη συντήρησή τους και τέτοια χρωματογραφικά συστήματα δεν είναι πάντα διαθέσιμα σε τοξικολογικά εργαστήρια ρουτίνας και χρησιμοποιούνται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς.

Στη διεθνή βιβλιογραφία το GC είναι συνδεδεμένο με διάφορους ανιχνευτές όπως ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) [95,101] ή ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD) [102,103] οι οποίοι χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανάλυση ενός ή δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Σε μία μόνο περίπτωση έχει χρησιμοποιηθεί ο ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (φλουοξετίνη, αμιτριπτυλίνη, νορτριπτυλίνη, μαπροτιλίνη και κλομιπραμίνη) [104]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο αέριος χρωματογράφος είναι συνδεδεμένος με φασματόμετρο μαζών (MS) που λειτουργεί είτε με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) [89,92,94,105] είτε με αρνητικό χημικό ιονισμό (NCI) [97] ενώ σε κάποιες περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) [90,97,105].

Οι στήλες που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί στους αέριους χρωματογράφους ήταν οι DB-5MS [94,97,106] και HP-5MS [90,95,99,109] σε διάφορες διαστάσεις. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί επίσης οι στήλες Rtx-1 [107]. Στις περισσότερες των περιπτώσεων ως φέρον αέριο έχει χρησιμοποιηθεί το ήλιο (He_2) [89,91,92] ενώ σε μία μόνο περίπτωση έχει χρησιμοποιηθεί το άζωτο (N_2) [90].

Σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με GC το στάδιο της εκχύλισης ακολουθείται από το στάδιο της παραγωγωποίησης. Το στάδιο

αυτό είναι απαραίτητο για να βελτιωθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά κάποιων αναλυτών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες όπως αμινομάδες ή υδροξυλομάδες. Με την παραγωγωποίηση αυξάνεται η πτητικότητα και η θερμοανθεκτικότητα μερικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Για το στάδιο αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα αντιδραστήρια παραγωγωποίησης, όπως N,O-δισ(τριμεθυλοσιλνυλ)-τριφθοροακεταμίδιο (N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA) με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorosilane, TMCS [90], πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης (PFPA) [97,98] και επταφθοροβουτυρικός ανυδρίτης (HFBA) [108,109].

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά. Ο προσδιορισμός τους έχει επιτευχθεί με διάφορους τύπους ανιχνευτών. Τέτοιοι είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους (UV) [91,110,111] σε διάφορα μήκη κύματος (215nm, 254nm κ.α). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική ανίχνευσης φωτοδιοδίων (PDA) [112]. Στις περισσότερες δημοσιεύσεις έχει χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής MS και MS/MS για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων συνήθως με την τεχνική του ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) [113-116].

Οι στήλες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην υγρή χρωματογραφία είναι πάρα πολλές όπως Acquity UPLC HSS T3 διαφόρων διαστάσεων [112,117], οι Zorbax Extend C18[110] και οι Acquity BEH C18 με την Acquity BEHC18 Van Guard ως προστήλη [118]. Στις τεχνικές που περιλαμβάνουν την υγρή χρωματογραφία σημαντικό ρόλο παίζει και η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον παράγοντα χωρητικότητας των αναλυτών που μπορεί να μεταβληθεί με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Ένα μεγάλο πλήθος κινητών φάσεων έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Μερικές από αυτές τις κινητές φάσεις είναι ακετονιτρίλιο:νερό (σε διάφορες αναλογίες) [117,119], ακετονιτρίλιο:ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηγκικού αμμωνίου pH 3,2 [113], τετραϋδροφουράνιο:οξικό αμμώνιο [115] κλπ.

Οι δημοσιευμένες αναπτυχθείσες αναλυτικές μεθοδολογίες για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά με τη χρήση των τεχνικών GC και LC συνοψίζονται τους Πίνακες 1-2. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ή περισσότερων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, μετά από κατάλληλη κατεργασία του βιολογικού δείγματος.

3.3 Συνδυασμένη τεχνική αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

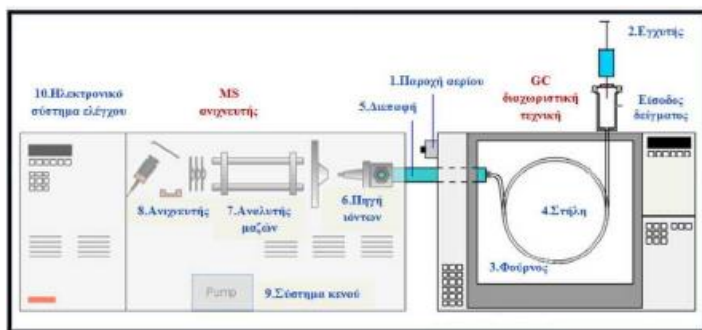
Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα για την ανάλυση δειγμάτων. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται γενικά στην ανάλυση πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων (φάρμακα, ναρκωτικά, τρόφιμα κ.α). Τα προς ανάλυση δείγματα μπορούν να βρίσκονται τόσο στην υγρή όσο και στην αέρια μορφή τους.

Με τον συνδυασμό αυτό επιτυγχάνεται ποιοτικά η ταυτοποίηση των ενώσεων από το φασματόμετρο μαζών και ο ποσοτικός διαχωρισμός του δείγματος στα επιμέρους συστατικά από τον αέριο χρωματογράφο.

Τα βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται ο αέριος χρωματογράφος [Σχήμα 12] είναι:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Στήλη
- Ανιχνευτής

Ο αέριος χρωματογράφος επιτυγχάνει το διαχωρισμό των ενώσεων με κριτήριο την πτητικότητα τους ή με βάση τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά (μοριακό βάρος, μέγεθος μορίου κ.α). Στη συνέχεια οι ενώσεις εισέρχονται στο φασματόμετρο μαζών, όπου θραυσματοποιούνται και ταυτοποιούνται από τις βιβλιοθήκες με βάση τις διαφορές των λόγων μάζας προς φορτίο m/z (τα θραύσματα τους). Ο λόγος τους είναι αντιπροσωπευτικός της σχετικής μάζας του σωματιδίου σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων του [120].



Σχήμα 12: Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης βασικών τμημάτων συστήματος GC/MS

Πίνακας 1. Μέθοδοι προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφία (GC)

Β.Π	Ουσία	Βιολογικό υλικό	Μέθοδος Εκχύλισης	Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ(ng/mL)	Γραμμικότητα	Εσωτερικό Πρότυπο
Ali Akbar Alizadeh Nabil και συν. 2014	Νορτριπυλίνη Μαπροτιλίνη	ούρα	DLLEME 1)εκχύλιση 1,1,2,2-τετραχλωροαιθάνιο 2) διαλύτης διασκορπισμού DMF	CP-Sil 8 (30 m x 0,25mm x 0,25μm)	He ₂	FID	N: 2/10 M: 4/12	10-4000 12-4000	-
Vassiliki A. Boumba και συν 2016	Μιρταζαπίνη Κλομιπραμίνη Σιταλοπράμη Σερτραλίνη	Πλάσμα, ορός, αίμα	Chem. Elut Αλκαλικό pH Έκλουση διχλωρομεθάνιο: 2-προπανόλη (90:10,v/v)	Equity 5 (30 mx 0.25 mm, που περιέχει 5% diphenyl/95% dimethylsiloxanex 0.25 μm)	He ₂	MS(EI)	M: 2,50/8,33 Ci: 3.75/12.50 Ci: 4.69/12.63 Ser: 7.50/25.00	8.33-400 12.5-400 15.625-500 25.00-400	Κυκλοβενζαπρίνη
N. Cartiser και συν 2011	Σιταλοπράμη	Αίμα, χολή, ούρα, υαλοειδές υγρό, ιστοί	LLE(αλκαλοποίηση, TBME)	HP-5MS (30 m x 0.250 mm x 0.25 μm).	N ₂ , He ₂	MS/MS(EI)	-	-	Σιταλοπράμη d-6
Xiujuan Chen και συν 2017	Φλουοξετίνη Μαπροτιλίνη Σερτραλίνη Σιταλοπράμη Μιρταζαπίνη	Αίμα	LLME (αλκαλοποίηση, τολουόλιο)	DB-5ms 5% φαίνυλ-μεθυλοσιλικόνη, 30mx 0,25 mm. 0,25 μm)	He ₂	MS(EI)	F: -/15 M: -/15 Ser: -/5 Cit: -/15 Mir: -/5	15-1500 15-1500 5-500 15-500 5-500	Νορφλοοξετίνη, Παροξετίνη d6
S. H. Cosby και συν 1995	Νορτριπυλίνη	Αίμα	SPE (Supelclean-ENVicarb, TFA/ μεθανόλη, ξυλένιο/μεθανόλη Bond-Elut PRS αμμωνία/μεθανόλη/ethy-acetate)	Rtx-1(25m x 0.25 mm x 1μm)	He ₂	MS(EI)	-	-	Διφαινυλοπιραλίνη
Julien Deglon και συν 2010	Φλουοξετίνη	DBS	LLE 0,02% τριαιθυλαμίνη;βουτυλοχλωρίδιο	DB-5MS, 15m x 0.25 mm x 0.25μm	He ₂	NICI-MS/MS	F: 0,02 ¹ /1 ⁻	-	Φλουοξετίνη d6 Παροξετίνη d6
Mir Ali Farajzadeh και συν 2014	Φλουοξετίνη Νορτριπυλίνη	Πλάσμα Ούρα	D-LLME 1,1,2,2-τετραχλωροαιθάνιο	HP-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm)	He ₂	FID ή MS	F: 9/27(πλάσμα) 2/7 (ούρα) N: 6/18(πλάσμα) 1/5(ούρα)	30-100000 8-100000 20-100000 8-100000	Πικολίνη
Pratik Kumar Jagtap και συν 2017	Νορτριπυλίνη	Αίμα Ούρα	HF-DDSME	DB-5 (30 m x 0.25 mm x 1 micron)	He ₂	MS(EI)	-	-	Προτριπυλίνη
Alaa Khraiwesh και συν 2011	Σερτραλίνη Δεσμεθυλο Σερτραλίνη	Αίμα	SPE Bond Elut LRC Certify οξικός αιθυλεστέρας; ισοπροπανόλη; αμμωνία (85:15:3)	HP-5MS (5% phenyl-methylsilicone, 30 m x 0.25 mm ID, and 0.25 m	He ₂	MS(EI)	S: 0.30μg/L / 1.00 μg/L DS: 0.30μg/L / 1.00 μg/L	1-500 1-500	Προτριπυλίνη
Xiao-Pen Lee και συν 1997	Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη	Αίμα	SPME	DB-1 fused-silica capillary columns (30 m x 0.32mm, 0.25μm)	He ₂	FID	-	-	-

Katerina Liveri και συν 2016	Μιρταζαπίνη	Αίμα Ούρα	SPE	ZB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	He ₂	MS(EI)	-	-	Μεθακουαλόνη
Jan Magdalan και συν 2013	Κλομιπραμίνη	Αίμα Υαλοειδές υγρό Δείγμα ιστού	LLE pH9, 4mL οξικός αιθυλεστέρας	HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	He ₂	MS(EI)	-	-	Κλομιπραμίνη-d3
M.A. Martfnez και συν 2002	Βενλαφαξίνη Σερτραλίνη	Αίμα	1) Chem Elut (ρυθμιστικό διάλυμα pH9 & υδατικό διάλυμα μεπιβακαΐνης) 2) SPEC ₁ BondElut (διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη: αμμωνία 78:14:8)	25 m x 0.20 mm x 0.11μm	He ₂	NPD	V: Chem Elut: 39/128 Bond Elut C ₁ : 24/ 79 S: Chem Elut: 153/504 Bond Elut C ₁ : 100/330	-	-
M.A. Martfnez και συν 2003	Φλουοξετίνη Αμιτριπτυλίνη Νορτριπτυλίνη Μαπροτιλίνη Κλομιπραμίνη	Αίμα	1) ChemElut (ρυθμιστικό διάλυμα pH9 & υδατικό διάλυμα μεπιβακαΐνης) 2) SPEC ₁ BondElut (διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη: αμμωνία 78:14:8)	25 m x 0.20 mm x 0.11μm	He ₂	NPD	F: : Chem Elut: 123/411 Bond Elut C ₁ : 66/220 A: Chem Elut: 146/485 Bond Elut C ₁ : 8/ 25 Ma : Chem Elut: 61/203 Bond Elut C ₁ : 37/125 Clo: Chem Elut: 84/281 Bond Elut C ₁ : 67/223	-	Πραζεπάμη
M.A. Martfnez και συν 2004	Σιταλοπράμη	Αίμα	1) Chem Elut (ρυθμιστικό διάλυμα pH9 & υδατικό διάλυμα μεπιβακαΐνης) 2) SPEC ₁ Bond Elut (διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη: αμμωνία 78:14:8)	25 m x 0.20 mm x 0.11μm	He ₂	NPD	Ci : Chem Elut: 143/476 Bond Elut C ₁ : 21/ 70	-	Πραζεπάμη
O Mastrogiani και συν 2011	Βενλαφαξίνη	Αίμα	HS SPME	Alltech EC-5 (30 m x 0.32 mm, 0.25 μm)	He ₂	NPD	3 / 10	-	-
Chizukos. και συν	Μιρταζαπίνη Σερτραλίνη	Αίμα Ούρα Στομοαχικό Περιεχόμενο	SPE (Waters Oasis HLB) έκπληση: μεθανόλη 5% έκλουση: μεθανόλη	HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm)	He ₂	MS(EI)	-	-	Ιμιπραμίνη d6
Sioufi και συν 1988	Κλομιπραμίνη	Αίμα	LLE 1 mLρυθμιστικό διάλυμα (pH αλκαλικό) 4.5mLn-επτάνιο : ισοάμυλο-	12.5 m x 0.2mm	He ₂	MS	-/ 1	-	Κλομιπραμίνη d6

			αλκοόλη (99:1)						
TrutaL. Και συν 2016	Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη Μιρταζαπίνη Νορτριπυλίνη Σιταλοπράμη Φλοουξετίνη Σερτραλίνη Βενλαφαξίνη	Αίμα	SPE (Waters Oasis HLB) έκπληση: μεθανόλη 5% έκλουση: μεθανόλη	5% φαίνυλο- μέθυλο τριχοειδής στήλη (30mx 0.25mm, 0.25mm)	He ₂	MS/MS(EI)	A:4.0/12.1 N:5.2/15.6 M:3.3/10 S:9.7/29.3 Ci:5.0/15.2 Cl:7.1/21.5 F:7.1/21.6 V:9.3/28.3	A:30-3990 N:30-3990 M:20-3980 S:40-4000 Ci:10-3970 Cl:30-3990 F:30-3990 V:30-3990	Κλομιπραμίνη d3
Filonzi dos Santos και συν 2016	Αμιτριπυλίνη Νορτριπυλίνη	Υαλοειδές υγρό	LPME έκλουση:0.1M φορμικό οξύ	HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25μm)	He ₂	MS(EI)	A:1.0/5.0 N: 1.05.0	-	Αμιτριπυλίνη d3 Νορτριπυλίνη d3
Papoutsis και συν 2011		Αίμα	SPE Bond Elut LRC Certify οξικός αιθυλεστέρας:ισοπροπανόλη: αμμωνία (85:15:3)	HP- 5MS capillary column (5% phenyl- methylsilicone, 30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)	He ₂	MS(EI)			Προτριπυλίνη

Πίνακας 2. Μέθοδοι προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφία (LC)

Β.Π	Ουσία	Βιολογικό υλικό	Μέθοδος Εκχύλισης	Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ(ng/mL)	Γραμμικότητα	Εσωτερικό Πρότυπο
Chia-Ni Lin και συν. 2014	Αμιτριπυλίνη, Κλομιπραμίνη	ούρα	-	Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 50mm x 8μm)	Ακετονιτρίλιο: Νερό (1:1) με 0,1% φορμικό οξύ	MS/MS(ESI)	-	100-2000 200-4000	-
Vera Alves και συν. 2015	Φλουοξετίνη Κλομιπραμίνη	ούρα	MEPS (μεθανόλη ακετονιτρίλιο 80:20,νερό)	Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100mm x 1,7μm)	Νερό(0,1% φορμικό οξύ): Ακετονιτρίλιο	PDA(227nm φλουοξετίνη, 252nm κλομιπραμίνη, 239nm IS)	F: 0.080/0.1 CI: 0.074/0.1	-	Κλοζαπίνη
Nadege Castaing και συν. 2007	Βενλαφαξίνη Δισμέθυλο Βενλαφαξίνη	Ολικό αίμα	LLE (υδροχλωρικό 0,05N)	RP18 100 x 2.1mm	Ακετονιτρίλιο: Buffer pH 3,2	MS/MS(ESI)	-	V: 5-500ng/mL DV: 5-500ng/mL	Μιασπαίνη
Erin E. Chambers και συν. 2014	Αμιτριπυλίνη Νορτριπυλίνη	Ούρα	SPE Oasis Elution Sorbent Selection 96-well plate(2% φορμικόοξύ:ακετονιτρίλιο 60:40)	UPLC BEH C18, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 m	Φορμικό οξύ 0,1%(ή 0,1% αμμώνιο) : μεθανόλη(ή ακετονιτρίλιο)	MS/MS (EI)	A: -/0.02 N: -/0.02	0.02-250 0.02-250	-
Ali Esrafilii και συν. 2007	Αμιτριπυλίνη Σεραλίνη	Πλάσμα, ούρα	FB-LLME	Zorbax Extend C18 column (100 mm x 2.1 mm 3.5 μL particle size)	Οξικό οξύ(pH 4):μεθανόλη 54:46	UV (215nm)	A: 0.5 / 1.7 Ser:0.7/ 2.3	5-500 5-500	χλωροπρομαζίνη
Merie A. Everson και συν. 1989	Αμιτριπυλίνη Νορτριπυλίνη	Υαλοειδές υγρό	C ₁₈ SepPak Έκλουση: μεθανόλη	Zorbaxa (25 cmx 4.6 mm, κυανοπρότυλο, 5-6-μm)	Οξικό οξύ(0.5M)-ακετονιτρίλιο-n-βουτυλαμίνη (60/40/0.0022)	UV (254nm)	16,7	-	Δεσμεθυλο-κλομιπραμίνη
Mahdi Ghorbani και συν. 2016	Μιρταζαπίνη	ούρα	DSPME(μεθανόλη)	Shim-Pack VP-ODS C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5.0 μm)	Ακετονιτρίλιο-φωσφορικό οξύ/δισόξινο φωσφορικό κάλιο pH 3 (30:70 v/v)	UV(294nm)	0,4/0,9	0,9-450	-
Bengt-Ake Hulten και συν. 1992	Αμιτριπυλίνη	Αίμα	LLE (αιθέρας, επτάνιο)	LDC Constametric IIG pump	-	UV(254nm)	-	-	Δεσμεθυλο-μιπραμίνη
Sys Stybe Johansen	Σιταλοπράμη	Αίμα	LLE(butyl acetate)	Astec (250 x 4.6 mm Chirobiotic V)	Μεθανόλη: Αμμωνία: Οξικό Οξύ (1000:1:1)	MS/MS(ESI)	0.001mg/kg /0.005mg/kg	-	Διβενζεπίνη
Maria Kingbäck και συν. 2010	Βενλαφαξίνη	Πλάσμα Αίμα	SPE(ακετονιτρίλιο: τριφλουοροικό οξύ)	250 mm x 2.1 mm Chirobiotic V	Τετραυδροφουράνιο: Αμμωνία pH6 (10:90)	MS/MS(PESI)	-	-	Μεξιλετίνη
L. Kristofferse n και συν. 1999	Σιταλοπράμη Φλουοξετίνη Παροξετίνη	Αίμα	AutoSPEC ₁₈ (τριφλουοροοξικό οξύ σε μεθανόλη)	C ₁₈ column (150 33.9 mm, 5 mm)	Αμμωνία: Φορμικό Οξύ	UV	C: -/0.025μmol/l F: -/ 0.10μmol/l P: -/ 0.025μmol/l	-	Προτριπυλίνη
Wen Liu και συν.	Βενλαφαξίνη	Πλάσμα	LLE (αιθέρας)	BDS HYPERSIL C18 (5 m, 250 mm x 4.6 mm)	Νερό: Ακετονιτρίλιο (60:40)	MS/ESI	0,4/3,5	4-700	Εσταζολάμη

2006									
Deborah Montenarh και συν 2014	Αμιτριπτυλίνη Σιταλοπράμη Κλομιπραμίνη Φλουοξετίνη Μαπροτιλίνη Μιρταζαπίνη Νορτριπτυλίνη Σερτραλίνη Βενλαφαξίνη	Πλάσμα	-	SunFire C18 column (2.1×150 mm, 3.5 μm)	διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου συν 0,1% με μυρμηκικό οξύ pH 3,4 (A) : ακετονιτρίλιο με 0,1% μυρμηκικό οξύ (B)	MS/MS(ESI)	A: 0.001/0.025 Ci: 0.01/0.02 Clo: 0.005/0.025 F: 0.15/0.2 Ma: 0.01/0.06 Mir: 0.01/0.02 Nor: 0.008/0.025 Ser: 0.01/0.02 V: 0.0025/0.005	-	Τριμπραμίνη d3
Roulioroulou s A. και συν 2018	Αμιτριπτυλίνη Σιταλοπράμη Φλουοξετίνη Μιρταζαπίνη Νορτριπτυλίνη Σερτραλίνη Βενλαφαξίνη	Αίμα	a. εκχύλιση με K ₂ CO ₃ , MgSO ₄ και ακετονιτρίλιο b. καθαρισμός με MgSO ₄ και PSA για αφυδάτωση και απομάκρυνση πολικών ενδογενών συστατικών	Acquity BEH C ₁₈ (150 × 2.1 mm, 1.7 μm) και Acquity BEH C ₁₈ VanGuard pre-column (5 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)	Διάλυμα νερού σε 0.1% μυρμηκικό οξύ (A) : ακετονιτρίλιο-νερό 95: 5 (B)	MS/MS(ESI)	A:0.3/1 C:0.3/1 F:3/10 M:3/10 N:0.03/1 S:1.7/5 V:3/10	A:1-500 C:1-100 F:10-6000 M:10-1000 N:1-500 S:5-500 V:10-6000	Μιδαζολάμη
Andreas T. Roemmelt και συν 2015	Αμιτριπτυλίνη Σιταλοπράμη Κλομιπραμίνη Φλουοξετίνη Μαπροτιλίνη Μιρταζαπίνη Σερτραλίνη Βενλαφαξίνη	Αίμα	LLE ακετονιτρίλιο	SynergiPolar RPcolumn (100 x 2.0 mm 2.5 μm , 100A) με C ₁₈ προστατευτική στήλη (2.0 mm × 4.0 mm)	25 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου με 0,1% οξικό οξύ (A) : ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ (B).	Q-TOF MS(PI)	A: -/30 Ci: -/23 Clo: -/24 F: -/60 Ma: -/36 Mir: -/12 S: -/18 V: -/7	-	Αμιτριπτυλίνη d3 Κλομιπραμίνη d3 Φλουοξετίνη d3 Δεσμεθυλο φλουοξετίνη d6 Βενλαφαξίνη d6
Samanidou V. και συν 2009	Βενλαφαξίνη Φλουοξετίνη	Πλάσμα Ούρα	SPE (Waters Oasis HLB) Μεθανόλη ακετονιτρίλιο 1:1	Insertsil ODS-3 (250 x 4.00mm , 5μm)	Ακετονιτρίλιο: οξικό αμμώνιο (0.05M, 41:59, v/v)	UV-vis	Πλάσμα: V:0.1/0.4 F:0.2/0.7 Ούρα V:0.8/2.3 F:0.4/1.2	-	Βαμφοουλίνη
Smith G. και συν 1982	Αμιτριπτυλίνη Νορτριπτυλίνη	Αίμα	-	στήλη από ανοξειδωτο χάλυβα (250mmx 2.0 mm, 5μm)	Ακετονιτρίλιο: Μεθανόλη: Οξικό αμμώνιο (93:7:0.4)	UV	A:2/- N:6/-	-	Προπρανολόλη
Steuer A. και συν 2015	Αμιτριπτυλίνη Νορτριπτυλίνη Σιταλοπράμη Κλομιπραμίνη Φλουοξετίνη Μιρταζαπίνη Σερτραλίνη Βενλαφαξίνη Δεσμεθυλο	Αίμα	Κατακρίμνηση Πρωτεϊνών (PP) 600μL ακετονιτρίλιο	1. Phenomenex Synergy Polar RP column (100 mm × 2.0 mm, 2.5 μm) 2. Halo® PhenylHexyl column (50 mm × 0.5 mm, 2.7 μm),	1. 50 mM ρυθμιστικού φορμικού αμμωνίου σε νερό που περιέχει μυρμηκικό οξύ 0,3% (v/v) (pH 3,5, A) και ακετονιτρίλιο που	MS(P-ESI)	A:0.3,0.3/25 N:0.3, 0.3/25 Ci:0.3,10.0/5 Clo:0.6,0.6/10 F:0.8,1.6/25 M:0.2,2.5/5 S:0.3,0.3/5 V:0.3,0.3/40 DV:1.2,40.0/40	-	Σιταλοπράμη d6 Κλομιπραμίνη d3 Φλουοξετίνη d6 Βενλαφαξίνη d6

	βενλαφαξίνη				περιέχει 0,1% (ο / ο) οξικό οξύ (B).				
Titier K. και συν 2007	Μαπροτιλίνη Νορτριπυλίνη Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη	Αίμα	LLE Διάλυμα εξανίου:ισοαμυλική αλκοόλη (99:1)	Xterra RP18 (100 x 2.1 mm)	Ακετονιτρίλιο : ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου	Tandem MS/MS(PESI)	-	-	Μιανσερίνη
Unceta N. και συν 2010	Μιρταζαπίνη Μαπροτιλίνη Παροξετίνη Σερτραλίνη Αμιτριπυλίνη Νορτριπυλίνη	Ούρα	-	Extrasil ODS column (25 cm × 0.4 cm 5μm)	TMACl (pH 4; 0.4%) : ακετονιτρίλιο (40:60, v/v)	FLD	-	-	-
Unceta N. και συν 2010)	Σιταλοπράμη	Ούρα	-	Zorbax Eclipse XDB-CN column (150 x 4.6 mm, 5μm)	μυρμηκικό αμμώνιο (30 mM) : ακετονιτρίλιο (30:70, v /v)	MS/MS(PESI)	2/5	-	S-Σιταλοπράμη d6
Xin Zhou και συν 2016	Αμιτριπυλίνη	Ούρα Ήπαρ	SPE (Waters Oasis HLB) έκπληση: μεθανόλη, νερό έκλυση: μεθανόλη	Ultimate XB-C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)	0.1% μυρμηκικό οξύ σε 5 mM οξικό αμμώνιο (A) και ακετονιτρίλιο (B).	MS/MS	-	-	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

4.1 Εισαγωγή

Το υαλοειδές υγρό είναι ένα ζελατινώδες υγρό το οποίο περιέχεται στον οπίσθιο θάλαμο του ματιού ανάμεσα στον φακό και τον αμφιβληστροειδή και αποτελείται κατά 98-99% από νερό [121]. Ο όγκος του είναι περίπου 4 mL και το βάρος του 4g καταλαμβάνοντας μεγάλο ποσοστό του όγκου του βολβού. Πέραν του υαλουρονικού οξέος και των κολλαγόνων ινών, έχει παρόμοια σύσταση με το υδατοειδές υγρό [122,123].

Στην τοξικολογία το υαλοειδές υγρό χρησιμοποιείται πλέον ευρέως ως εναλλακτικό βιολογικό υλικό. [124,125]. Η έλλειψη αγγείωσης και η σχετική προστασία από το βολβό καθιστούν το υαλοειδές υγρό μια ιδιαίτερα χρήσιμη εναλλακτική λύση όταν δεν μπορεί να γίνει δειγματοληψία αίματος ή σε περίπτωση μεταθανάτιας ανακατανομής [126-129] ή μόλυνσης από βακτήρια ή χημικές ουσίες (π.χ. ταρίχευση) [130,131]. Η δειγματοληψία του είναι εύκολη και λόγω της καθαρότητάς του ως βιολογικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανοσολογική ανάλυση αρκετών ομάδων χημικών ουσιών [132,133]. Η χρησιμότητά του υαλοειδούς υγρού έχει αναγνωριστεί στον ποιοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού χημικών ουσιών, ενώ η χρήση του στον ποσοτικό προσδιορισμό παραμένει περιορισμένη. [134]

4.2 Ανατομία και σύνθεση του υαλοειδούς υγρού

Ο φακός διαχωρίζει τον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού, ο οποίος περιέχει το υδατοειδές υγρό, από τον οπίσθιο θάλαμο, στον οποίο περιέχεται το υαλοειδές υγρό (Σχήμα 13) [135]. Ο οπίσθιος θάλαμος οριοθετείται, από μέσα προς τα έξω, από την μεμβράνη του αμφιβληστροειδούς, από το χοριοειδές και το σκληρό χιτώνα στο πίσω μέρος του οφθαλμού και από το ακτινωτό σώμα και το φακό στο μπροστινό μέρος.

Η ζελατινώδης του δομή οφείλεται σε ινδικές πρωτεΐνες, κυρίως ίνες κολλαγόνου που συνδέονται με υδατάνθρακες γλυκοζαμινογλυκάνης (κυρίως υαλουρονικό οξύ). Έχουν εντοπιστεί 1205 πρωτεΐνες στο υαλοειδές υγρό [136]. Περιέχει επίσης ηλεκτρολύτες (όπως νάτριο, κάλιο, χλώριο, γαλακτικό και ασκορβικό οξύ), υδατάνθρακες (όπως γλυκόζη) και μικρές ποσότητες άλλων πρωτεϊνών (όπως η οπτικήνη) [137]. Λίγα κύτταρα όπως τα υαλοκύτταρα

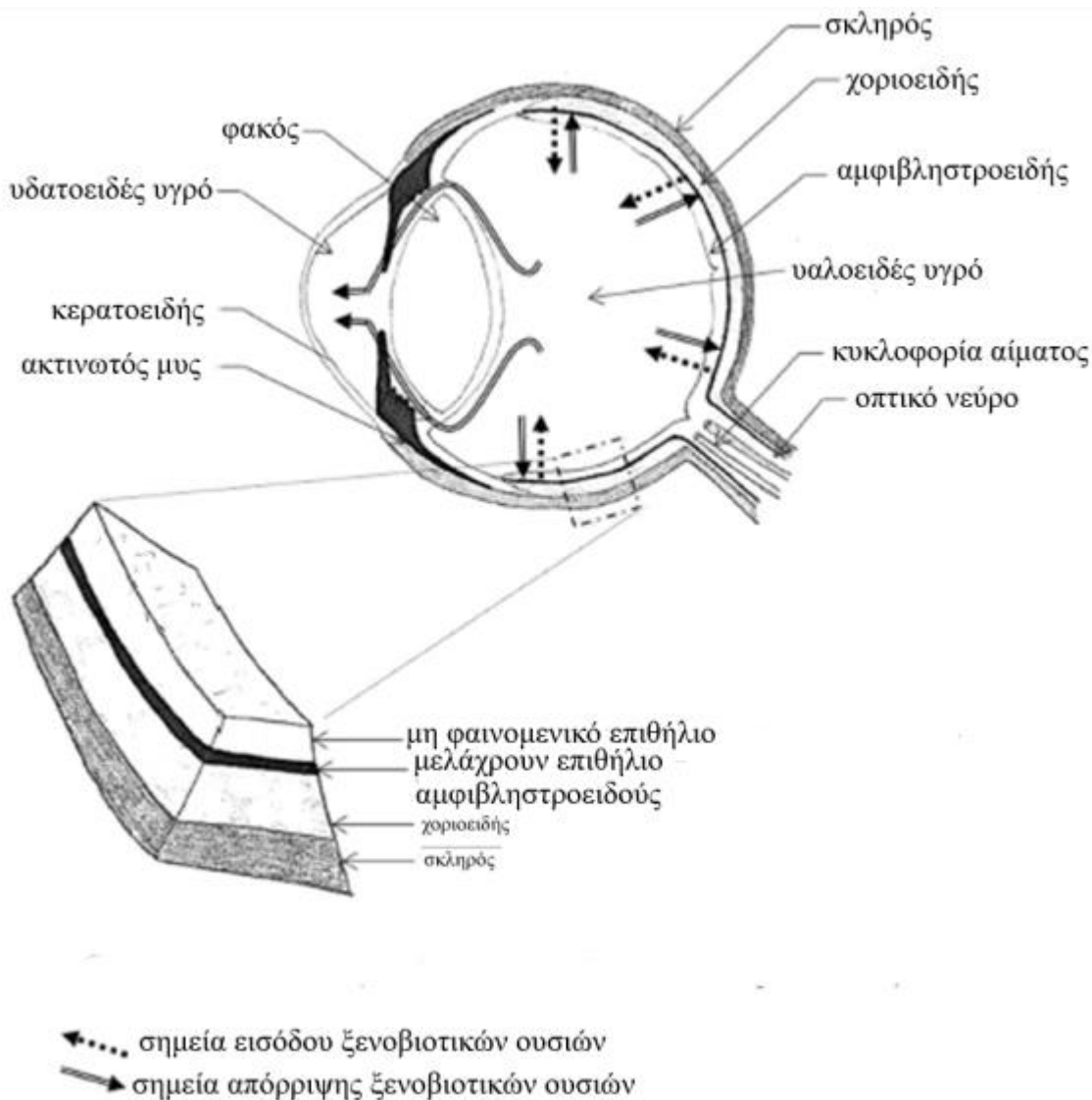
βρίσκονται διάσπαρτα στην υαλοειδική κοιλότητα. Δεν είναι γνωστός ο ακριβής τους ρόλος αλλά έχουν εκκριτικές και φαγοκυταρρικές ιδιότητες.

Με την αύξηση της ηλικίας του ατόμου παρατηρείται διαφοροποίηση της σύστασης του υαλοειδούς υγρού και σταδιακή ρευστοποίησή του. Ρευστοποίηση ονομάζεται ο σχηματισμός οπτικά κενών κοιλοτήτων που προκύπτουν από τη διάσπαση του υαλουρονικού οξέος [122]. Στα άτομα ηλικίας 4 ετών, το υαλοειδές υγρό αντιπροσωπεύει το 20% του συνολικού όγκου του ματιού και αυξάνεται σε ποσοστό άνω του 50% σε ηλικίες 80-90 [138].

4.3 Ξενοβιοτική ανταλλαγή αίματος και υαλοειδούς υγρού

Οι ξενοβιοτικές ουσίες από τη συστηματική κυκλοφορία, διεισδύουν στο υαλοειδές υγρό διαμέσου του αιματο-αμφιβληστροειδούς φραγμού [139]. Ο αιματο-αμφιβληστροειδής φραγμός είναι αυτός, ο οποίος επιτρέπει την είσοδο ουσιών που απαιτούνται για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς και εμποδίζει εκείνη των πιθανώς παθογόνων ουσιών (π.χ. ενζύμων, αναφυλατοξίνων κλπ.) [68]. Αυτό αποτελείται από δύο φράγματα (σχήμα 13). Το πρώτο φράγμα, το οποίο περιλαμβάνει το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, διαχωρίζει τον αμφιβληστροειδή από το χοριοειδές, και είναι το εξωτερικό φράγμα. Τα κύτταρα του μελάγχρουν επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς έχουν την ιδιαιτερότητα ότι συνδέονται μεταξύ τους με διακυτταρικές συνδέσεις, αναγκάζοντας την ενδοκυτταρική διέλευση των ενώσεων. Το δεύτερο, το οποίο αποτελεί το μη φαινομενικό επιθήλιο των αιμοφόρων αγγείων του αμφιβληστροειδούς, είναι το εσωτερικό φράγμα. Τα δύο φράγματα δεν είναι διαδοχικά, αλλά πιθανότατα συνδέονται με τις δύο οδούς διείσδυσης του αμφιβληστροειδούς, τα χοριοειδή τριχοειδή για το εξωτερικό φράγμα και τα τριχοειδή αγγεία του αμφιβληστροειδούς για το εσωτερικό φράγμα αντίστοιχα. Η επιλεκτικότητα διείσδυσης των ενώσεων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με τις συχνότερες από αυτές να είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας ο οποίος σχετίζεται με την ηλικία [140].

Έχουν περιγραφεί δύο οδοί απομάκρυνσης από το υαλοειδές υγρό: μία οπίσθια οδός μέσω του φραγμού προς την αντίθετη κατεύθυνση της εισόδου των ουσιών και μία πρόσθια οδός με διάχυση στο υδατοειδές υγρό μέσω των χωρικών περιοχών (Σχήμα 13), με απομάκρυνση των ουσιών μέσω της ανανέωσης του υδατοειδούς υγρού και της ροής του αίματος [141].



Σχήμα 13: Η ανατομία του ματιού και το φράγμα αίματος-αμφιβληστροειδούς

4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ξενοβιοτική διείσδυση στο υαλοειδές υγρό

Η διείσδυση μιας ξενοβιοτικής ουσίας στον αμφιβληστροειδή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της ουσίας, οι φυσικοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητές της, ο όγκος κατανομής, η δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος και η σχετική διαπερατότητα των φραγμών [139]. Οι ουσίες μπορούν να περάσουν στο υαλοειδές υγρό είτε με παθητική διάχυση, είτε με ενεργή μεταφορά μέσω του φραγμού. Γενικά, όσο υψηλότερο είναι το μοριακό βάρος ή/και η υδροφιλικότητα μιας ουσίας, τόσο πιο πιθανό είναι ότι η διέλευση της από το φραγμό να γίνει με ενεργή μεταφορά [142]. Σε περιπτώσεις υψηλών συγκεντρώσεων των ουσιών στο αίμα,

περιορίζεται η ενεργητική μεταφορά λόγω κορεσμού, μειώνεται η μεταφορική ικανότητα μέσω του αιματο-αμφιβληστροειδούς φραγμού, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο υαλοειδές υγρό να είναι μικρότερες σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις τους στο αίμα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι μόνο οι μη δεσμευμένα με πρωτεΐνες ουσίες μπορούν να διασχίσουν βιολογικές μεμβράνες, το ποσοστό δέσμευσης της πρωτεΐνης πλάσματος είναι ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη διάχυση. Σε μελέτη μεγάλου αριθμού ενώσεων τοξικολογικού ενδιαφέροντος, οι Holmgren και συν. βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αναλογίας των συγκεντρώσεων ουσιών αίματος/υαλοειδούς υγρού με το ποσοστό σύνδεσής τους με τις πρωτεΐνες πλάσματος [143].

4.5 Δειγματοληψία υαλοειδούς υγρού

Το υαλοειδές υγρό παραλαμβάνεται με σύριγγα και η αναρρόφηση πρέπει να γίνεται αργά, από το κέντρο του βολβού, ώστε να αποφευχθεί παραλαβή επιθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς ή της ίριδας. Για τον ίδιο λόγο, ο όγκος πρέπει να περιορίζεται στα 2 mL ανά μάτι, παρόλο που ο συνολικός όγκος του υαλοειδούς υγρού είναι μεγαλύτερος [144]. Ο παραλαμβανόμενος όγκος στο πτώμα μπορεί να αντικατασταθεί από νερό ή φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα ώστε να διατηρηθεί η όψη του βολβού [145]. Οι διαδικασίες ολικής δειγματοληψίας έναντι μικροποσοτήτων (50 µL) συγκρίθηκαν σε μελέτες χρησιμοποιώντας κουνέλια ως πειραματόζωα [146]. Η δειγματοληψία μικροποσοτήτων φάνηκε πιο αναπαραγωγίμη στην ανίχνευση ιόντων (ασβεστίου, χλωριούχα, καλίου, νατρίου και φωσφόρου), αλλά προς το παρόν είναι αρκετά περιορισμένη στην τοξικολογική ανάλυση για τον προσδιορισμό φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών.

4.6 Χρήση του υαλοειδούς υγρού στη δικαστική τοξικολογία

Το 1969, οι Felby και Olsen [124] δημοσίευσαν μία από τις πρώτες μελέτες για τη ανάλυση φαρμάκων σε μεταθανάτια δείγματα υαλοειδούς υγρού. Σε αυτή τη μελέτη, οι συγκεντρώσεις των βαρβιτουρικών στο υαλοειδές υγρό ήταν παρόμοιες με αυτές στο υπερδιήθημα αίματος, αλλά διαφορετικές σε σύγκριση με του ολικού αίματος, δείχνοντας ότι τα βαρβιτουρικά διεισδύσουν με παθητική διάχυση στο υαλοειδές υγρό. Συμπέραναν ότι η λήψη υαλοειδούς υγρού πέραν του αίματος είναι αρκετά σημαντική κυρίως σε περιπτώσεις σήψης. Από την πρώτη χρήση του στη Δικαστική Τοξικολογία, το υαλοειδές υγρό, λόγω των πλεονεκτημάτων που έχει, όπως η καθαρότητα του δείγματος, έχει χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά

από μελέτες για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φαρμάκων, ναρκωτικών και άλλων ουσιών.

Σε 20 περιπτώσεις θανάτου από ηρωίνη, οι Scott και Oliver ανέφεραν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μορφίνης στο υαλοειδές υγρό σε σύγκριση με το αίμα, με σημαντική συσχέτιση ($r = 0.697$) μεταξύ τους. Με αυτά τα δεδομένα οι συγγραφείς θεώρησαν ότι το υαλοειδές υγρό ήταν ιδανικό εναλλακτικό βιολογικό υλικό για την ανάλυση της μορφίνης απουσία αίματος. Οι συγκεντρώσεις της 6-μονοακέτυλο μορφίνης στο υαλοειδές υγρό ήταν μεγαλύτερες από ό, τι στο αίμα, χωρίς όμως να υπάρχει κάποιος συσχετισμός [147].

Οι μεταθανάτιες συγκεντρώσεις της κοκαΐνης στο αίμα σπάνια αντιστοιχούν σε αυτές κατά την ώρα του θανάτου, κυρίως λόγω της μεταθανάτιας ανακατανομής. Το υαλοειδές υγρό είναι ένα από τα βιολογικά υλικά στα οποία η συγκέντρωση μιας ξενοβιοτική ουσία θεωρείται σχετικά σταθερή κατά την πρώτη μεταθανάτια περίοδο και η εφαρμογή του ως βιολογικό υλικό για την ποσοτικοποίηση της κοκαΐνης έχει μελετηθεί ευρέως. Οι Fernandez και συν. ανέφεραν πως οι συγκεντρώσεις της κοκαΐνης στο υαλοειδές υγρό ήταν παραπλήσιες με εκείνες του αίματος (μέση αναλογία 1.03, εύρος 0.36-2.94), με σημαντικό συντελεστή συσχέτισης ($r=0.71$). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το υαλοειδές υγρό μπορούσε να επιβεβαιώσει την παρουσία κοκαΐνης απουσία αίματος, αλλά δεν μπορούσε να εκτιμήσει με ακρίβεια τη συγκέντρωση στο αίμα [148].

Σε ένα σύνολο 17 περιστατικών που αφορούσαν προσδιορισμό βενζοδιαζεπινών, οι Scott και Oliver ανέφεραν συντελεστές συσχέτισης 0.788 για τη τεμαζεπάμη, 0.723 για τη διαζεπάμη και 0.068 για τη νορδιαζεπάμη. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις στο υαλοειδές υγρό ήταν χαμηλότερες απ' ό,τι στο αίμα. Αν και εντοπίστηκαν συσχετισμοί, οι συγγραφείς ανέφεραν μια μεγάλη διασπορά στα αποτελέσματα, που πιθανότατα σχετίζεται με παραλλαγές σε παραμέτρους όπως τη λήψη ή μη τροφής, και ο χρόνος μεσολάβησης από το θάνατο μέχρι τη δειγματοληψία. Συμπεράναν ότι οι συγκεντρώσεις των βενζοδιαζεπινών στο υαλοειδές υγρό δεν μπορεί να αποτελέσει ερμηνεία των επιπέδων στο αίμα, εξαιτίας των χαμηλών συσχετισμών για κάποιες βενζοδιαζεπίνες και της μεγάλης διασποράς που βρέθηκαν στα αποτελέσματα [149].

Οι Holmgren και συν. [143] μελέτησαν τη συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων αίματος και του υαλοειδούς υγρού 46 ενώσεων διαφόρων ομάδων φαρμάκων σε δείγματα που

ήταν αποθηκευμένα στους -20°C για διάστημα 12 μηνών. Συσχετίσεις εμφανίστηκαν για τις μισές ουσίες ($n = 23$), συμπεριλαμβανομένου της βενλαφαζίνης, ενώ για ενώσεις όπως η κλομιπραμίνη και η σερτραλίνη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων για ορισμένα φάρμακα, δεν μπορούσε να γίνει συσχέτιση συγκεντρώσεων ανάμεσα στο υαλοειδές υγρό και το αίμα.

Οι Anastos και συν. μελέτησαν τη συσχέτιση των συγκεντρώσεων του αίματος και του υαλοειδούς υγρού για τη σιταλοπράμη που ήταν 0.4 mg/L και 0.2 mg/L αντίστοιχα, ενώ σε μια περίπτωση υπερδοσολογίας βρήκαν 0.8 mg/L και 0.3 mg/L αντίστοιχα [150]. Οι Barbera και συν. διαπίστωσε υψηλές συγκεντρώσεις της σιταλοπράμης τόσο στο αίμα όσο και στο υαλοειδές υγρό (0.758 mg/L και 1.129 mg/L , αντίστοιχα). Οι ερευνητές κατέληξαν ότι αυτές οι συγκεντρώσεις της σιταλοπράμης, μπορεί πιθανότατα να υποδηλώνουν μια κατάσταση χρόνιας χρήσης του φαρμάκου παρά μία κατάσταση οξείας δηλητηρίασης [151]. Οι Kirkton και συν. σε 6 περιστατικά ανίχνευσαν μιρταζαπίνη τόσο στο αίμα όσο και στο υαλοειδές υγρό. Οι τιμές κυμαίνονταν κατά μέσο όρο στα 2.0 mg/L στο αίμα και στα 0.78 mg/L στο υαλοειδές υγρό [152].

Η χρήση των εναλλακτικών βιολογικών υλικών στην Δικαστική Τοξικολογία έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές, ιδίως σε περιπτώσεις έλλειψης των κλασικών βιολογικών υγρών όπως αίματος, ούρων κλπ., σε περιπτώσεις σήψης ή πιθανής μεταθανάτιας ανακατανομής των ουσιών. Ιδανικά αυτά θα πρέπει να επιτρέπουν την ανίχνευση των ίδιων ξενοβιοτικών ουσιών που ανιχνεύονται και στο αίμα και σε συγκεντρώσεις που να συσχετίζονται με αυτό. Το υαλοειδές υγρό είναι ένα εναλλακτικό βιολογικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, λόγω των τεχνικών πλεονεκτημάτων που έχει, για το σκοπό αυτό. Στην περίπτωση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, το υαλοειδές υγρό έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενός ή δύο φαρμάκων σε αυτό. Για το λόγο αυτό, σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου που θα επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων για να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό με εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε υποθέσεις δικαστικού ενδιαφέροντος.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατρικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ήταν η μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό και η συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους με τις αντίστοιχες στο αίμα. Για το λόγο αυτό ήταν σημαντική η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό με τη χρήση της τεχνικής του GC-MS η οποία στη συνέχεια θα μπορεί να εφαρμοστεί σε υποθέσεις δικαστικού ενδιαφέροντος καθώς το υαλοειδές υγρό αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό εναλλακτικό βιολογικό υλικό, ιδίως σε περιπτώσεις που τα συμβατικά βιολογικά υλικά όπως το αίμα και τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα.

Στην εν λόγω εργασία συμπεριελήφθησαν τα πιο σημαντικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα που κυκλοφορούν και χρησιμοποιούνται στον Ελλαδικό χώρο, τα οποία είναι η αμιτριπυλίνη, η σιταλοπράμη, η κλομιπραμίνη, η νορτριπυλίνη, η φλουοξετίνη, η μαπροτιλίνη, η δεσμεθυλομαπροτιλίνη (μεταβολίτης της μαπροτιλίνης), η μιρταζαπίνη, η δεσμεθυλομιρταζαπίνη (μεταβολίτης της μιρταζαπίνης), η σερτραλίνη, η δεσμεθυλοσερτραλίνη (μεταβολίτης της σερτραλίνης), η βενλαφαξίνη και η δεσμεθυλοβενλαφαξίνη.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα αναπτυχθεί αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υπό μελέτη 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, καθώς και τεσσάρων μεταβολιτών τους στο υαλοειδές υγρό χρησιμοποιώντας την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (GC-MS), που πρόκειται για μια αξιόπιστη και ευαίσθητη τεχνική. Η τεχνική αυτή αποτελεί βασικό εξοπλισμό διαθέσιμο σχεδόν από κάθε εργαστήριο κλινικής ή δικαστικής τοξικολογίας παγκοσμίως και χρησιμοποιείται ως βασική αναλυτική τεχνική στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η προς ανάπτυξη μέθοδος θα πρέπει να δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αλλά και ποσοτικού προσδιορισμού των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό. Στο πλαίσιο των σύγχρονων απαιτήσεων της Αναλυτικής Τοξικολογίας για τη διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων, η μέθοδος θα πρέπει να συνδυάζει την υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, ειδικότητα και εκλεκτικότητα, σύντομο χρόνο ανάλυσης, αναπαραγωγιμότητα και ευκολία στην εφαρμογή με χαμηλό σχετικά κόστος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟΤΕΧΝΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, σετραλίνη και βενλαφαξίνη) και τεσσάρων μεταβολιτών τους (δεσμεθυλομαπροτιλίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, δεσμεθυλοσετραλίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη) στο υαλοειδές υγρό χρησιμοποιήθηκε ο οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός που περιγράφεται παρακάτω και παρασκευάστηκαν τα διαλύματα και πρότυπα βιολογικά δείγματα που περιγράφονται στη συνέχεια.

5.1 Αέριο χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματογράφο μαζών (GC-MS)

Το σύστημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου περιλαμβάνει:

1. Αέριο χρωματογράφο Agilent 6890N.
2. Φασματόμετρο μαζών Agilent, MSD5975 (εξοπλισμένο με πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, electron impact, EI).
3. Αυτόματος δειγματολήπτης Agilent, 7983B.
4. Αντλία κενού, Edwards.
5. Χρωματογραφική στήλη DB-5 MS (J & W Scientific), 30m x 0,25mm i.d, film thickness 0,25μm.
6. Λογισμικό πρόγραμμα: Chemstation της εταιρίας Hewlett Packard.

5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ακόλουθος:

1. Ατομικοί αναδευτήρες (Vortex), των εταιριών Chiltren και Labinco.
2. Θερμαινόμενες πλάκες της εταιρίας FISHER.

3. Σύστημα εξάτμισης εννέα θέσεων συνδεδεμένο με φιάλη αζώτου (Reacti-Vap), της εταιρίας PIERCE.
4. Ψηφιακό πεχάμετρο, της εταιρίας Metrohm.
5. Αναλυτικός ζυγός, της εταιρίας RAWWAG.
6. Φυγόκεντρος της εταιρίας ALRESA.
7. Σύστημα εκχύλισης στερεής φάσης είκοσι θέσεων της εταιρίας Varian.
8. Συσκευή Παρασκευή καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
9. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (2-20μL), της εταιρίας Thermo.
10. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200μL), της εταιρίας Gilson.
11. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (200-1000μL), της εταιρίας Gilson.
12. Ρύγχοι πιπετών (2-200μL) , της εταιρίας Gilson.
13. Ρύγχοι πιπετών (200-1000μL) , της εταιρίας Gilson.
14. Πλαστικές πιπέτες μια χρήσεως της εταιρίας SASTEST.
15. Γυάλινοι βαθμονομημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
16. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες.
17. Γυάλινα σιφόνια μετρήσεως βαθμονομημένα (1.00, 2.00, 5.00, 10.00mL).
18. Ογκομετρικός κύλινδρος (100mL).
19. Ογκομετρική φιάλη (100mL).

5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. Ακετόνη καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
2. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck
3. Ισοπροπανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
4. Νερό καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
5. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
6. Αμμωνία αναλυτική καθαρότητας, περιεκτικότητας 25%, της εταιρίας Merck.
7. Πυκνό οξικό οξύ (παγόμορφο, 98%) καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Merck.
8. Διένυδρο, δισόξινο φωσφορικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρίας Merck.
9. Επταφθοροβουτυρικός ανυδρίτης 99% (heptafluorobutyric anhydride, HFBA), της εταιρίας Fluka (Steinheim, Germany).

10. Τριφθοροξικός ανυδρίτης 99% (trifluoroacetic anhydride, TFAA) της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany).

5.4 Στήλες εκχύλισης

Οι στήλες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Bond Elut LRC Certify 130mg, 50/pk) της εταιρείας Agilent.

5.5 Βιολογικό υπόστρωμα

Το υαλοειδές υγρό που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό για τις ανάγκες της ανάπτυξης και επικύρωσης της μεθόδου ελήφθη από πραγματικά δείγματα που είχαν σταλεί για τοξικολογική διερεύνηση στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών στα οποία δεν διαπιστώθηκε η παρουσία των υπό μελέτη ουσιών και τελικώς έγινε ανάμιξή τους. Τα άγνωστα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της αναλυτικής μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε ήταν δείγματα από περιστατικά δικαστικού ενδιαφέροντος του Εργαστηρίου, στα οποία είτε είχαν ανιχνευθεί ένα ή περισσότερα αντικαταθλιπτικά φάρμακα κατά τον γενικό τοξικολογικό έλεγχο είτε υπήρχε ιστορικό λήψης φαρμάκων που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία.

5.6 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες αναφοράς (chemical reference standards) τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, σερτραλίνη και βενλαφαζίνη καθώς και οι βασικοί μεταβολίτες μερικών εξ αυτών, όπως η δεσμεθυλομαπροτιλίνη, η δεσμεθυλομιρταζαπίνη η δεσμεθυλοσερτραλίνη και η δεσμεθυλοβενλαφαζίνη αλλά και η προτριπυλίνη.

1. Αμιτριπυλίνη (Lundbeck, Copenhagen-Valby, Denmark)
2. Σιταλοπράμη (Lundbeck, Copenhagen-Valby, Denmark)
3. Κλομιπραμίνη (Novartis, Basel, Switzerland)
4. Νορτριπυλίνη (Lundbeck, Copenhagen-Valby, Denmark)
5. Φλουοξετίνη (Lilly, Windlesham, UK)
6. Μαπροτιλίνη (Novartis, Basel, Switzerland)
7. Δεσμεθυλομαπροτιλίνη (Novartis, Basel, Switzerland)

8. Μιρταζαπίνη (Organon, Rijnberg, Netherlands).
9. Δεσμεθυλομιρταζαπίνη (Organon, Rijnberg, Netherlands).
10. Σερτραλίνη (Pfizer Groton, CT, USA)
11. Δεσμεθυλοσερτραλίνη (Pfizer Groton, CT, USA)
12. Βενλαφαξίνη (Wyeth, New York, NY, USA)
13. Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη (Wyeth, New York, NY, USA)
14. Προτριπτυλίνη (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Για τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα τα οποία ήταν όλα σε στερεή μορφή, παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς για το κάθε αντικαταθλιπτικό φάρμακο συγκέντρωσης 1.00 mg/mL σε μεθανόλη, ζυγίζοντας ορισμένη ποσότητα από την κάθε στερεή ουσία και διαλύοντας την σε κατάλληλο όγκο διαλύτη (μεθανόλη), λαμβάνοντας υπόψη σε κάθε περίπτωση την καθαρότητα της ουσίας. Ως μέσον διάλυσης επιλέχθηκε η μεθανόλη, με βάση τη διαλυτότητα των υπό μελέτη ουσιών σε αυτούς τους διαλύτες, και τα διαλύματα που προέκυψαν φυλάσσονταν στους 4⁰C.

Η πρότυπη ουσία η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο ήταν η προτριπτυλίνη. Για αυτό παρασκευάστηκε πυκνό εσωτερικό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1.00 mg/mL σε μεθανόλη, ζυγίζοντας ορισμένη ποσότητα από την στερεή ουσία διαλύοντας την σε κατάλληλο όγκο διαλύτη (μεθανόλη), λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα της ουσίας.

Οι πρότυπες ουσίες αναφοράς και τα πρότυπα διαλύματα ουσιών αναφοράς και εσωτερικού προτύπου φυλάσσονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας ή του φορέα από όπου προμηθεύτηκαν και μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφερόταν στο πιστοποιητικό τους. Η φύλαξη των παραπάνω διαλυμάτων έγινε σε γυάλινα φιαλίδια σκούρου χρώματος και κατάλληλου όγκου, που έφεραν ετικέτες για την αναγραφή των στοιχείων τους, ενώ η θερμοκρασία φύλαξης τους, ήταν οι 4⁰C.

5.7 Μικτά διαλύματα εργασίας σε μεθανόλη για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων για τη διενέργεια των απαιτούμενων δοκιμασιών για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών της αναλυτικής τεχνικής και της τεχνικής προκατεργασίας του βιολογικού υλικού, παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας:

- αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμης, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη (συγκέντρωσης 50 µg/mL, διάλυμα Α), με ανάμειξη 50µL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1.00 mg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1.0 mL.

5.8 Μικτά διαλύματα εργασία σε μεθανόλη για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων υαλοειδούς υγρού.

Κατά το στάδιο της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας των υπό μελέτη φαρμάκων σε μεθανόλη στη συγκέντρωση 50.0 µg/mL (διάλυμα Α) όπως παρουσιάζεται παραπάνω, καθώς και τα τρία πιο αραιά διαλύματα:

- αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμης, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη (συγκέντρωσης 5.0 µg/mL, διάλυμα Α₁), με παραλαβή 400 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης Α συγκέντρωσης 50.0 µg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 4.0 mL.
- αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμης, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη (συγκέντρωσης 1.0 µg/mL, διάλυμα Α₂), με παραλαβή 800 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης Α συγκέντρωσης 5.0µg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 4.0 mL.
- αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμης, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη (συγκέντρωσης 0.1µg/mL, διάλυμα Α₃), με παραλαβή 400 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης Α συγκέντρωσης 1.0 µg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 5.5 mL.

Τα διαλύματα Α₁-Α₃ χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων βιολογικών δειγμάτων (υαλοειδούς υγρού) βαθμονόμησης (calibration samples, cal). Για την παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QCs) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα Α', Α₁', Α₂', Α₃' από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν

για τα δείγματα βαθμονόμησης από τα οποία τα A', A₁' είχαν ίδιες συγκεντρώσεις με τα A, A₁, ενώ τα A₂', A₃' είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από τα διαλύματα A₂ και A₃ αντίστοιχα, όπως φαίνονται στους Πίνακες 3-4.

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα εργασία που παρασκευάστηκαν, οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό βιολογικών δειγμάτων υαλοειδούς υγρού 1 mL, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των προτύπων βιολογικών δειγμάτων που προέκυψαν παρουσιάζονται επίσης στους Πίνακες 3-4.

Επιπλέον παρασκευάστηκε διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (συγκέντρωσης 0.2 µg/mL, διάλυμα B) σε μεθανόλη για τον εμβολιασμό των δειγμάτων βαθμονόμησης ελέγχου ποιότητας σταθερότητας και των αγνώστων δειγμάτων. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτού έγινε με αραιώση από το πυκνό διάλυμα της ουσίας συγκέντρωσης 1 mg/mL, και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 5.0 mL.

Πίνακας 3. Παρασκευή προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης (calibration samples, cal).

Όγκος εμβολιασμού (µL) σε 1.0 mL υαλοειδούς υγρού	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, µg/mL)	Τελική συγκέντρωση (ng/mL) πρότυπου βιολογικού δείγματος	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
50	A ₃ (0.100)	5.0	Cal1
100	A ₃ (0.100)	10.0	Cal2
30	A ₂ (1.00)	30.0	Cal3
100	A ₂ (1.00)	100.0	Cal4
50	A ₁ (5.00)	250.0	Cal5
100	A ₁ (5.00)	500.0	Cal6

Πίνακας 4. Παρασκευή προτύπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QCs).

Όγκος εμβολιασμού (µL) σε 1.0 mL υαλοειδούς υγρού	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, µg/mL)	Τελική συγκέντρωση (ng/mL) πρότυπου βιολογικού δείγματος	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
75	A ₃ (0.200)	15.0	QC1
75	A ₂ (2.00)	150.0	QC2
80	A ₁ (5.00)	400	QC3

5.9 Μικτά διαλύματα εργασίας για την μελέτη ειδικότητας της μεθόδου

Κατά το στάδιο της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό πραγματοποιήθηκε μελέτη ειδικότητας της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα παρακαταθήκης φαρμάκων και ναρκωτικών ουσιών ή μεταβολίτες τους σε μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, τα οποία μπορούσαν να συνυπάρχουν με τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα στα πραγματικά υπό ανάλυση βιολογικά δείγματα. Τα διαλύματα παρακαταθήκης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συγκέντρωσης 1.00 mg/mL σε μεθανόλη. Παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας των παραπάνω ουσιών συγκέντρωσης 10.0 μg/mL με ανάμιξη 20 μl από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης, εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂ και ανασύσταση με 2 mL μεθανόλη.

5.10 Ρυθμιστικό διάλυμα

Το ρυθμιστικό διάλυμα που παρασκευάστηκε, καθώς και ο τρόπος παρασκευής του παρουσιάζεται παρακάτω.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.0 (0.1 M): 7.8 g NaH₂PO₄ · 2H₂O διαλύθηκαν σε 500 mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίστηκε στο 6.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH 1.0 M.

5.11 Μίγμα διαλυτών έκλυσης της εκχύλισης στερεής φάσης

Το μίγμα διαλυτών έκλυσης των εκχυλίσεων στερεής φάσης που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευαζόταν εντός της ημέρας της ανάλυσης και ανανεωνόταν σε κάθε νέα σειρά δειγμάτων ανάλυσης. Η παρασκευή του διαλύματος έκλυσης γινόταν εντός του απαγωγού λίγο πριν τη χρήση του και σε όγκο που να επαρκεί για ολόκληρη τη σειρά των δειγμάτων ανάλυσης. Το μίγμα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση των υπό μελέτη ουσιών για τις εκχυλίσεις στερεής φάσης και ο τρόπος παρασκευής τους περιγράφεται παρακάτω:

- Οξικός αιθυλεστέρας: ισοπροπανόλη: αμμωνία (85:15:3, v/v/v): σε 1.5 mL ισοπροπανόλης προστίθεντο υπό ανάδευση αρχικά 300 μL αμμωνίας και στη συνέχεια 8.5 mL οξικού αιθυλεστέρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.1 Προκαταρκτική χρωματογραφική ανάλυση

Πριν την έναρξη των δοκιμασιών για τη βελτιστοποίηση της παραγωγοποίησης και της χρωματογραφικής ανάλυσης, συγκεκριμένη ποσότητα καθ' ενός από τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα ενέθηκε στον αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών και ελήφθησαν φάσματα μαζών της κάθε ουσίας με λειτουργία πλήρους σάρωσης ιόντων σε μια ευρεία περιοχή μαζών (m/z 50 έως 800). Συγκεκριμένα, 10 μL από παρασκευασμένο διάλυμα παρακαταθήκης 1.00 mg/mL καθενός από τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και ακολούθησε ανασύσταση με 100 μL οξικού αιθυλεστέρα και έγχυση 1 μL του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.

6.2 Βελτιστοποίηση της παραγωγοποίησης

Κάποια από τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα που μελετήθηκαν όπως η φλουοξετίνη, η μαπροτιλίνη, ο μεταβολίτης της η δεσμεθυλομαπροτιλίνη, ο μεταβολίτης της μριταζαπίνης η δεσμεθυλομριταζαπίνη, η νορτριπυλίνη, η σετραλίνη, ο μεταβολίτης της η δεσμεθυλοσετραλίνη, η βενλαφαξίνη και ο μεταβολίτης της η δεσμεθυλοβενλαφαξίνη είναι ουσίες που διαθέτουν στο μόριό τους μία λειτουργική ομάδα, αμινομάδα ή υδροξυλομάδα. Λόγω της παρουσίας αυτής της χαρακτηριστικής ομάδας στη δομή τους, κατά την ανάλυσή τους με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας οι ουσίες αυτές εμφανίζουν μη οξείες και μη συμμετρικές χρωματογραφικές κορυφές, που έχει ως αποτέλεσμα η μέθοδος να εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η τεχνική της παραγωγοποίησης των ουσιών αυτών που αποσκοπεί στη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς τους, αφού παράλληλα αυξάνεται η πτητικότητα και η θερμοανθεκτικότητά τους μέσω μείωσης της πολικότητάς τους. Επιπλέον,

με την αύξηση του μοριακού τους βάρους και την αλλαγή στη δομή του μορίου, η θραυσματοποίηση που πραγματοποιείται οδηγεί στην παραγωγή πιο χαρακτηριστικών θραυσμάτων με μεγαλύτερη ιοντική μάζα. Συνεπώς, το στάδιο της παραγωγοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και τη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς.

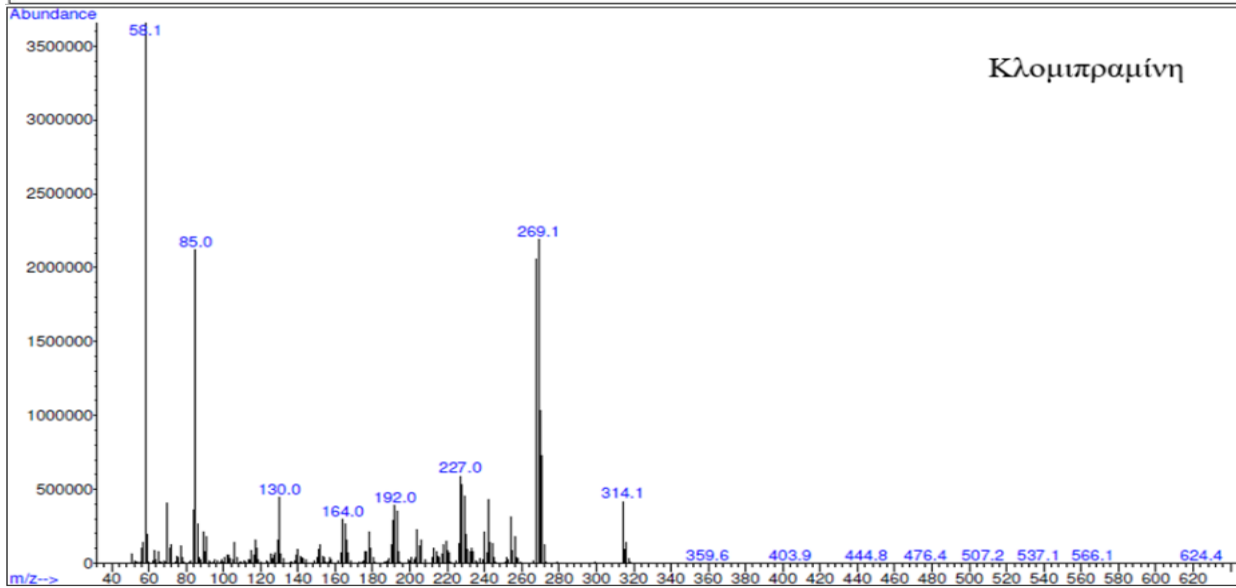
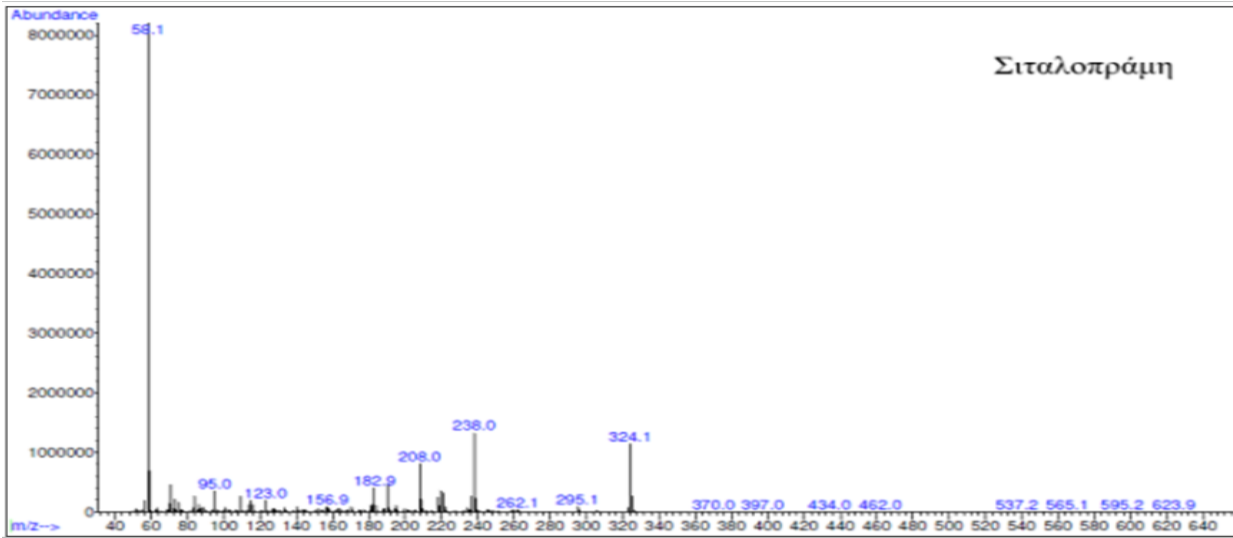
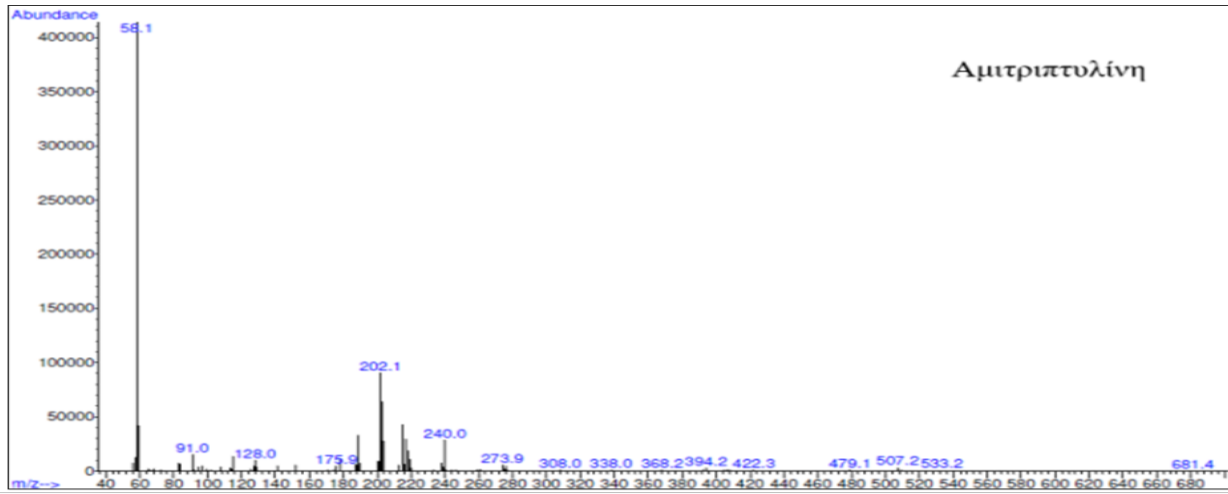
Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η τεχνική της παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες με δύο αντιδραστήρια παραγωγοποίησης και ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των παραγώγων των ουσιών αυτών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες, με λειτουργία πλήρους σάρωσης ιόντων σε μία ευρεία περιοχή μαζών (m/z 50 έως 800). Σε κάθε δοκιμασία παραγωγοποίησης, έξι διαφορετικά διαλύματα όγκου 10 μL από διάλυμα των ουσιών συγκέντρωσης 1.00 mg/mL για την κάθε ουσία εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης καθώς και οξικού αιθυλεστέρα και τα δείγματα παρέμεναν για 30 λεπτά σε αμμόλουτρο ρυθμισμένο στους 50°C. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που δοκιμάστηκαν και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

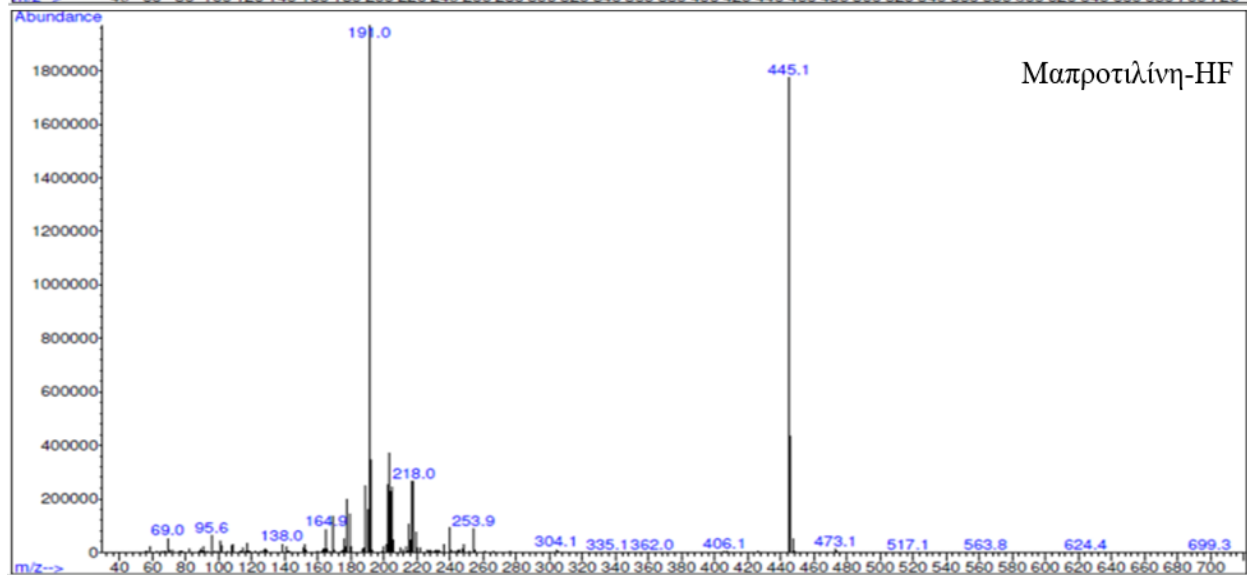
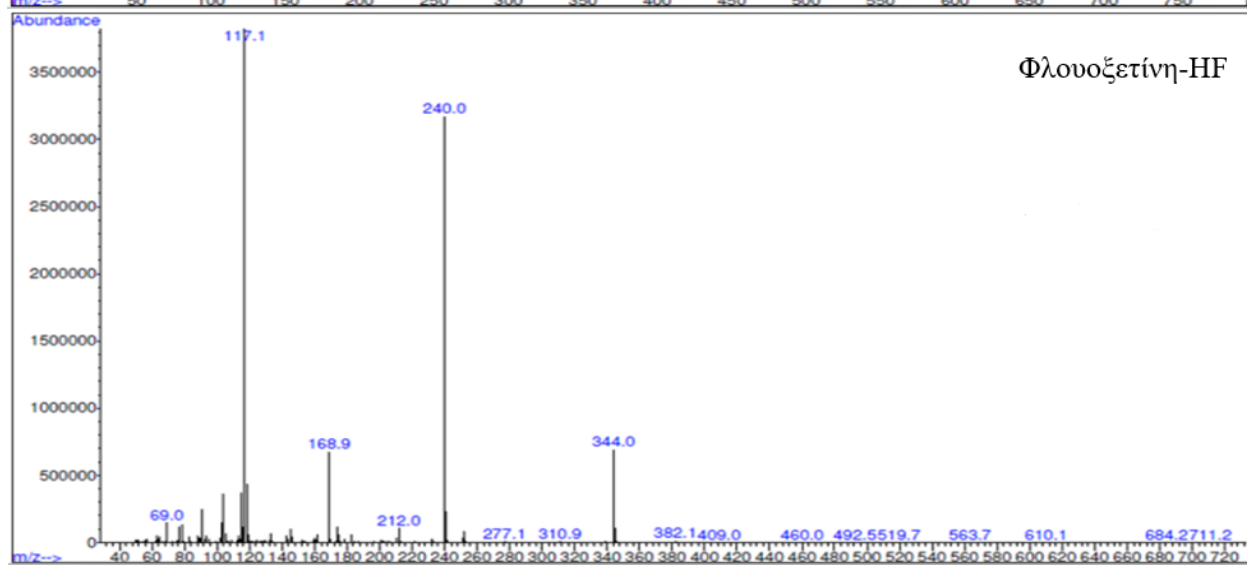
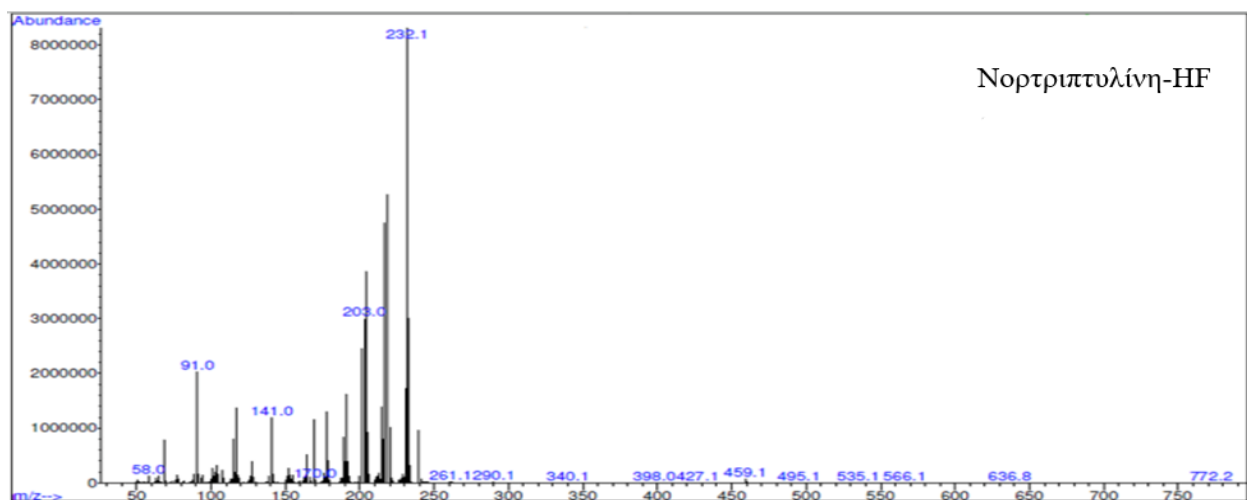
- 50 μL επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη 99% (HFBA) και 100 μL οξικού αιθυλεστέρα
- 50 μL τριφθοροξικού ανυδρίτη (TFAA) και 100 μL οξικού αιθυλεστέρα.

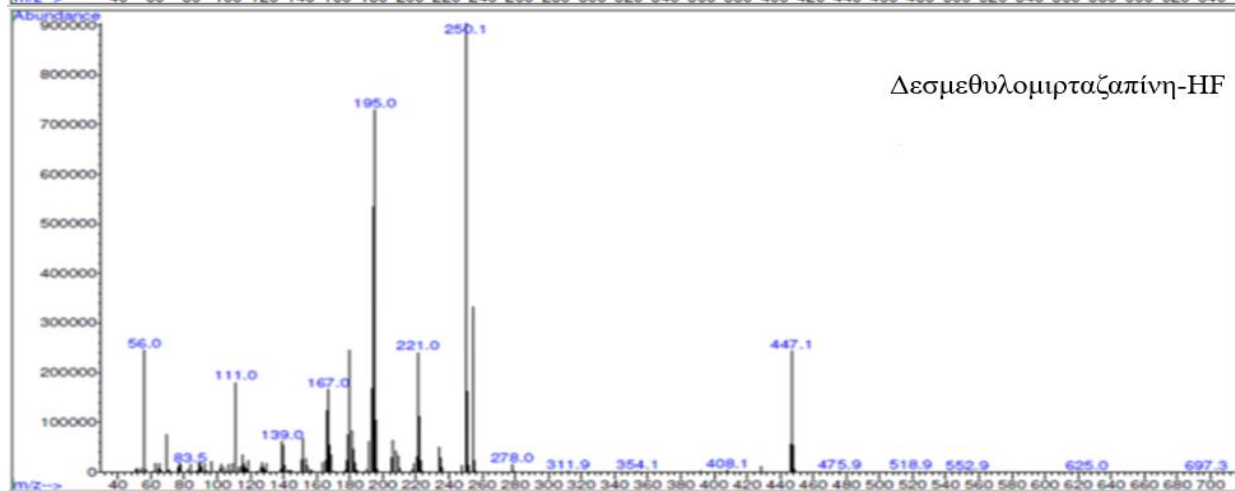
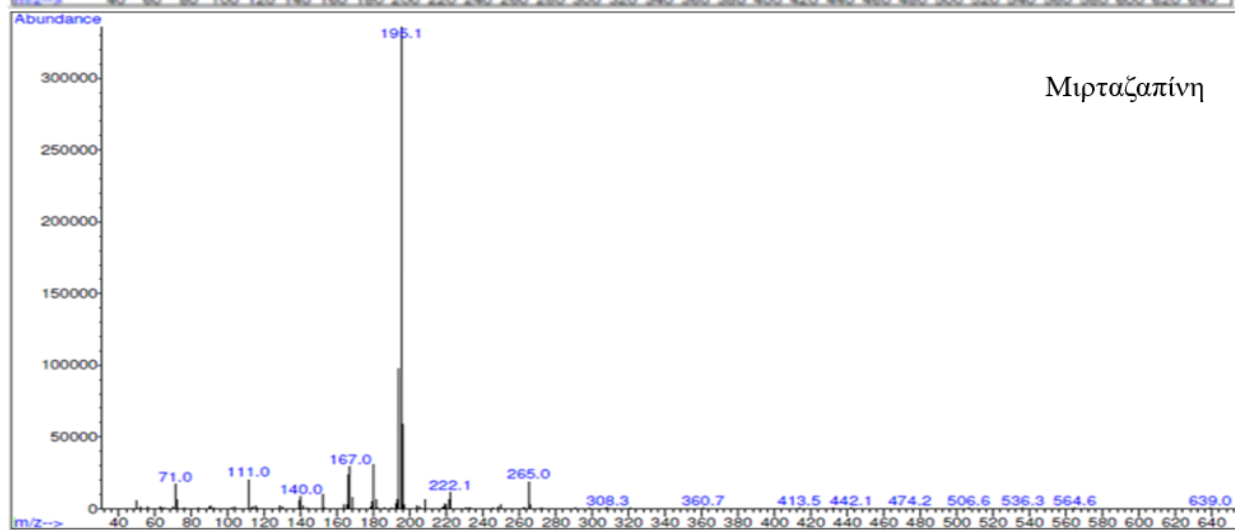
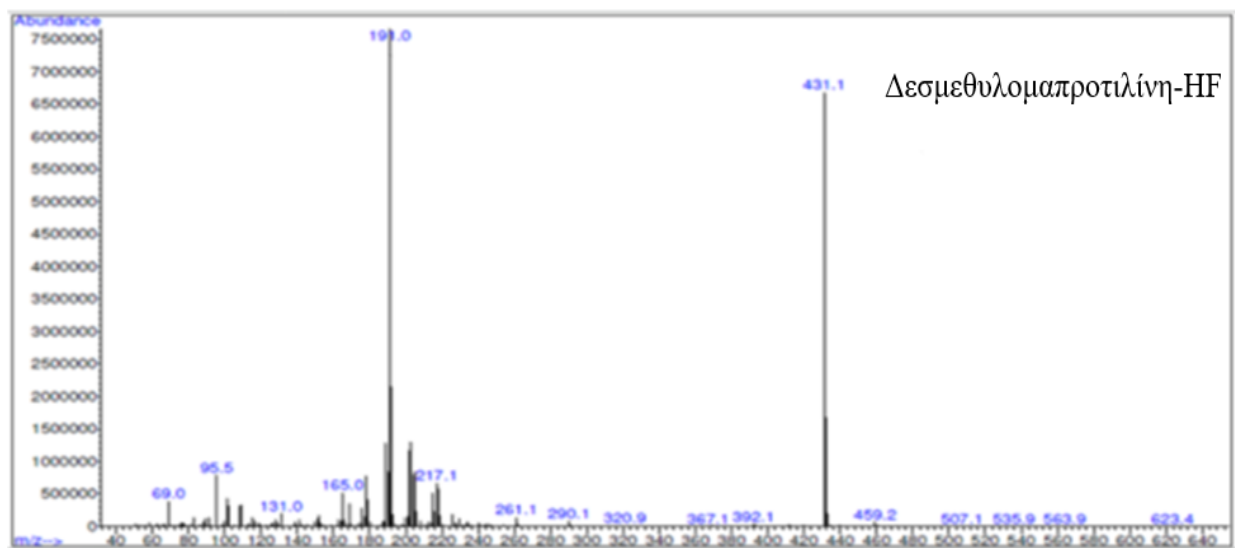
Τα δείγματα μετά την παραγωγοποίηση εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 , ακολουθούσε ανασύσταση με 50 μL οξικού αιθυλεστέρα και έγχυση 1 μL του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.

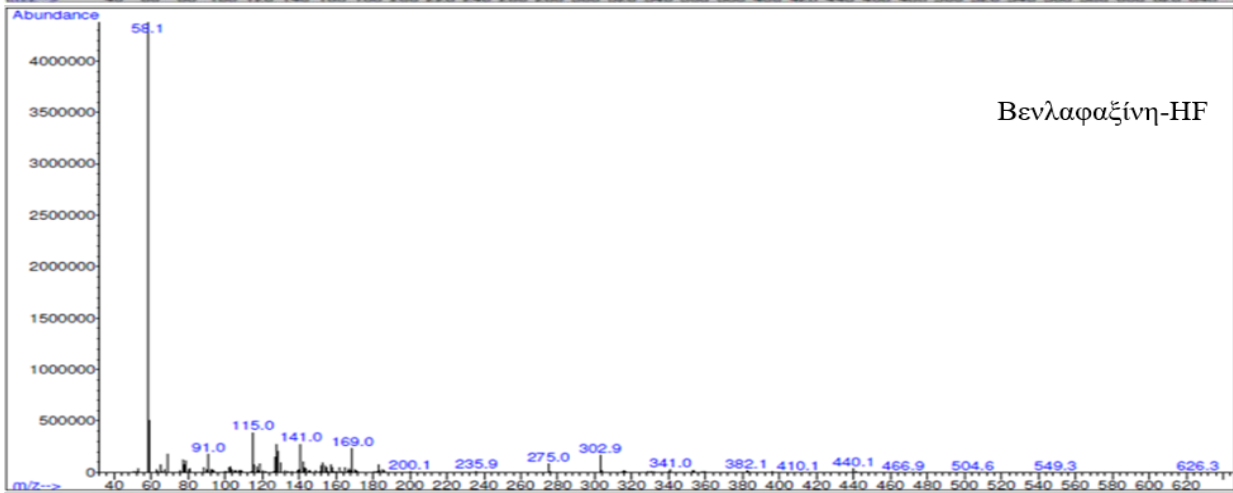
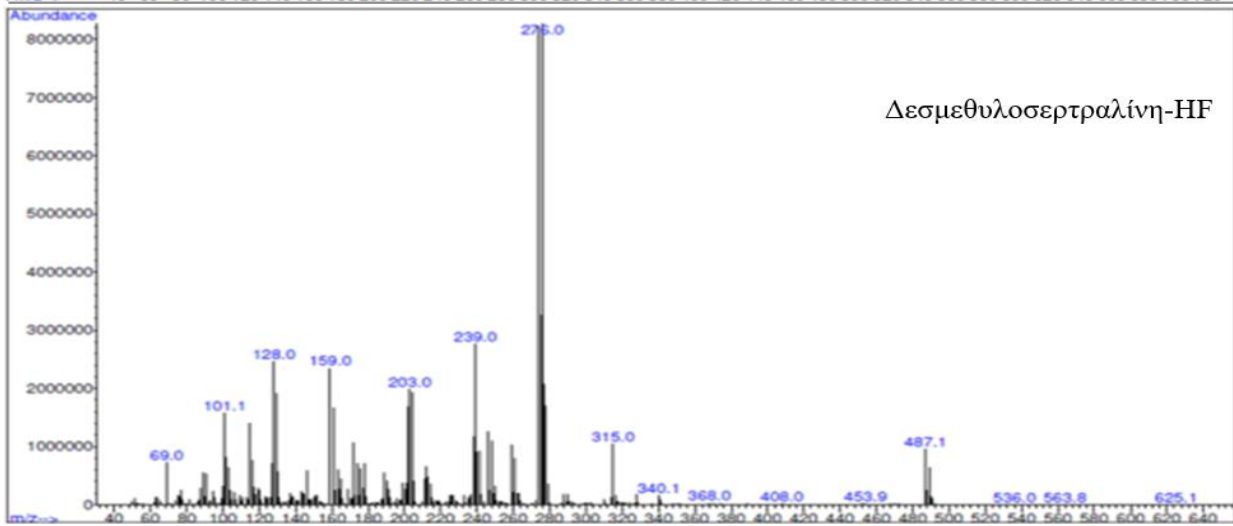
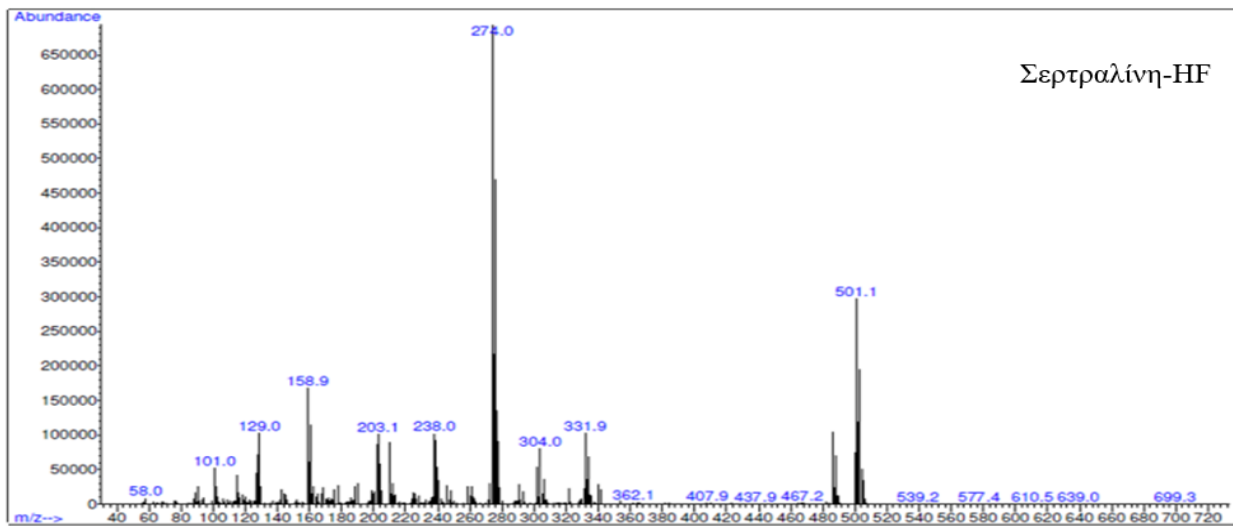
Η επιλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκε με κριτήρια την παραγωγοποίηση των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, τη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υπό προσδιορισμό ουσιών με μείωση της εμφάνισης «ουράς» στη χρωματογραφική κορυφή (tailing) και την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου προσδιορισμού. Η ακυλίωση με HFBA οδήγησε σε προϊόντα με καλύτερη ευαισθησία συγκριτική με το TFAA και γι αυτό προτιμήθηκε η παραγωγοποίηση να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια των δοκιμασιών με HFBA.

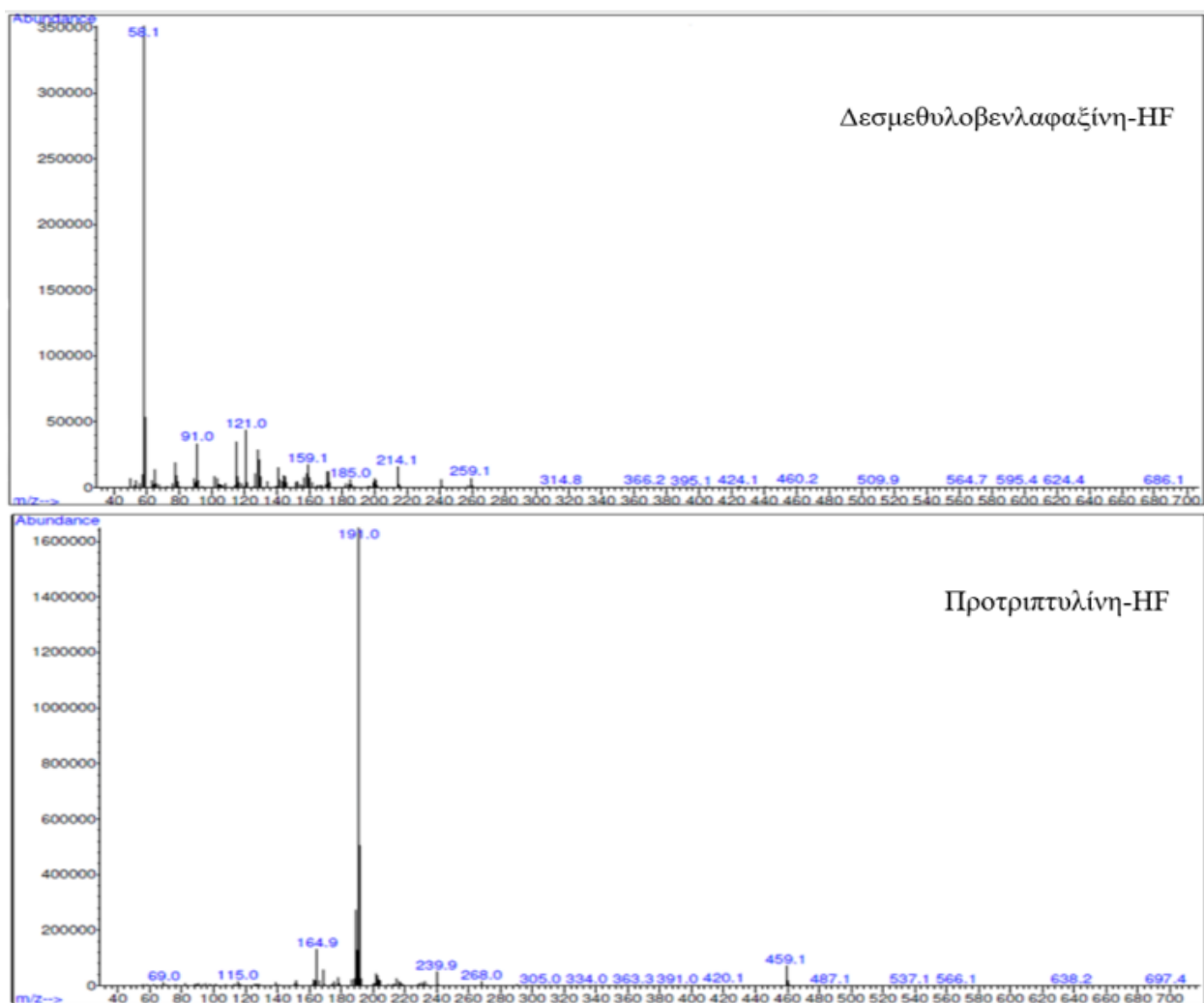
Τα φάσματα μαζών των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (παραγωγοποιημένων και μη) μετά από παραγωγοποίηση με HFBA που ελήφθησαν με ιοντισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) παρουσιάζονται στο Σχήμα 14.











Σχήμα 14: Φάσματα μαζών της αμιτριπτυλίνης, σιταλοπράμης, κλομιπραμίνης, νοτριπτυλίνης, φλουξετίνης, μαπροτιλίνης, δεσμεθυλομαπροτιλίνης, μιρταζαπίνης, δεσμεθυλομιρταζαπίνης, σετραλίνης, δεσμεθυλοσετραλίνης, βενλαφαξίνης, δεσμεθυλοβενλαφαξίνης και προτριπτυλίνης μετά από παραγωγωποίηση με HFBA.

Στη συνέχεια, όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM) με επιλογή τριών χαρακτηριστικών θραυσμάτων από τα φάσματα μαζών των όλων των υπό μελέτη ουσιών, ώστε να εξασφαλίζεται πληρέστερη ταυτοποίηση του κάθε αναλύτη. Το θραύσμα με την υψηλότερη απόκριση (θραύσμα με έντονη επισήμανση, (Πίνακας 5) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Τα τρία θραύσματα των μη παραγωγωποιημένων και των ακυλιωμένων παραγώγων που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5

Πίνακας 5. Τα τρία επιλεγμένα θραύσματα των παραγωγοποιημένων και μη υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.

Αναλύτης	Θραύσματα	Χρόνος ανάσχεσης (min)
Αμιτριπυλίνη	58, 202, 215	6,54
Σιταλοπράμη	58, 238, 324	7,08
Κλομιπραμίνη	58, 85, 269	7,14
Νοτριπυλίνη	232, 219, 204	6,99
Φλουοξετίνη	117, 240, 344	6,00
Μαπροτιλίνη	191, 445, 203	7,41
Δεσμεθυλομαπροτιλίνη	191, 431, 202	7,18
Μιρταζαπίνη	195, 180, 167	6,77
Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	195, 250, 447	7,06
Σερτραλίνη	274, 276, 501	7,47
Δεσμεθυλοσερτραλίνη	274, 276, 315	7,00
Βενλαφαξίνη	58, 115, 128	5,53
Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	58, 91, 121	5,80
Προτριπυλίνη	191,165, 459	7,12

6.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Η επιλογή των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών έγινε με βάση ήδη αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο αίμα από τους Papoutsis και συν. [108]. Οι χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των κατεργασμένων βιολογικών δειγμάτων υαλοειδούς υγρού κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού τους στο υαλοειδές υγρό και παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό.

Χρωματογραφικές συνθήκες	
Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	240 ⁰ C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	300 ⁰ C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	200 ⁰ C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1.0 mL/min
Αρχική θερμοκρασία στήλης (παραμονή)	100 ⁰ C (1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας στήλης	40 ⁰ C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης (παραμονή)	300 ⁰ C (4 min)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΑΛΟΕΙΔΟΥΣ ΥΓΡΟΥ

Ιδιαίτερα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των ουσιών αποτελεί το στάδιο της προκατεργασίας του βιολογικού δείγματος και της απομόνωσης των υπό προσδιορισμό ουσιών. Στην αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας ενός βιολογικού δείγματος οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η επιτυχία της εφαρμογής μιας αναλυτικής μεθόδου, όσον αφορά στην απομόνωση των αναλυτών και τον διαχωρισμό τους από τα ενδογενή συστατικά του βιολογικού υλικού.

Τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι ουσίες που παρουσιάζουν παρόμοια χημική συμπεριφορά. Με βάση τις λειτουργικές ομάδες που περιέχουν στο μόριό τους εμφανίζουν κυρίως αλκαλικές ιδιότητες, διότι τα φάρμακα αυτά περιέχουν μία ή περισσότερες αμινομάδες στο μόριό τους

7.1 Επιλογή εσωτερικού προτύπου

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης και της βελτιστοποίησης μιας μεθόδου περιλαμβάνεται και η επιλογή του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται στο υπό ανάλυση δείγμα πριν την εκχύλιση, για να αντισταθμιστεί οποιαδήποτε επόμενη απώλεια των ουσιών κατά την προκατεργασία του υπό μελέτη δείγματος. Επίσης, η παρουσία εσωτερικού προτύπου στο υπό ανάλυση δείγμα συμβάλλει στην ποσοτικοποίηση του αναλύτη η οποία επιτυγχάνεται με τον καθορισμό ενός παράγοντα απόκρισης για τον αναλύτη σε σχέση με το εσωτερικό πρότυπο, π.χ. ο λόγος των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών που λαμβάνονται για ίσες ποσότητες του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου. Το επιλεγόμενο εσωτερικό πρότυπο ιδανικά θα πρέπει να έχει μια παρεμφερή δομή με τον αναλύτη, να είναι σταθερό, να διαχωρίζεται χρωματογραφικά από τον αναλύτη και να εκλούεται κοντά στον αναλύτη (David G. Watson, 2011).

Στην αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, προτιμήθηκε να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο ουσία με παραπλήσια χημική δομή με τις προς μελέτη ουσίες. Το επιλεγόμενο εσωτερικό πρότυπο, επίσης, δεν μπορεί να περιέχεται σε πραγματικό βιολογικό δείγμα.

Με βάση τους προαναφερθέντες λόγους το εσωτερικό πρότυπο που επιλέχθηκε για τη μέθοδο προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων ήταν η προτριπτυλίνη.

7.2 Εκχύλιση στερεής φάσης εμβολιασμένων δειγμάτων υαλοειδούς υγρού

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης κατάλληλης μεθοδολογίας για την προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων εμβολιασμένων με τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης. Οι στήλες εκχύλισης στερεής φάσης που χρησιμοποιήθηκαν στο υαλοειδές υγρό, με βάση την μέθοδο των Paroutsis και συν. [108] ήταν οι Bond Elut LRC Certify της εταιρείας Agilent (μικτού τύπου, κατιοανταλλακτικές / μη πολικές στήλες).

Στην προκατεργασία της εκχύλισης στερεής φάσης, η ρύθμιση του pH του δείγματος πραγματοποιούταν με την προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με τις προδιαγραφές χρήσης της στήλης και τις χημικές ιδιότητες των υπό προσδιορισμό ουσιών, και στη συνέχεια ακολουθούνταν τα υπόλοιπα στάδια. Τα εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα υαλοειδούς υγρού παρασκευάζονταν όπως περιγράφεται από τους Πίνακες 3 και 4.

7.3 Μέθοδος προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό

Η τελική μέθοδος προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό περιλάμβανε:

1. Τοποθέτηση κατάλληλου αριθμού γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων και επισήμανση σύμφωνα με την ονομασία των δειγμάτων.
2. Προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 1mL υαλοειδούς υγρού με αυτόματη μηχανική πιπέτα.
3. Εμβολιασμός με κατάλληλο όγκο από το μικτό διάλυμα εργασίας των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (σε μεθανόλη) για την παρασκευή δειγμάτων βαθμονόμησης, ποιοτικού ελέγχου και σταθερότητας, όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 3 και 4 χρησιμοποιώντας αυτόματη μηχανική πιπέτα.
4. Προσθήκη 30 μL μίγματος εσωτερικού προτύπου προτριπτυλίνης (σε μεθανόλη) συγκέντρωσης 0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με αυτόματη μηχανική πιπέτα σε όλα τα δείγματα.
5. Προσθήκη 5 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.1 M) pH 6.0 στο δείγμα και φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.
6. Ενεργοποίηση των στηλών εκχύλισης στερεής φάσης Bond Elut Certify με διαδοχική εφαρμογή 2 mL μεθανόλης και 2mL πρόσφατα παρασκευασμένου μίγματος ρυθμιστικού

διαλύματος φωσφορικών (0.1 M) pH 6.0 δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή ώστε το υπόστρωμα της στήλης να μην ξηραίνεται.

7. Εφαρμογή του φυγοκεντρημένου δείγματος στη στήλη εκχύλισης με ταχύτητα ροής περίπου 1-2 mL/λεπτό.
8. Έκπλυση της στήλης διαδοχικά με 2 mL απιονισμένο νερό, 1 mL οξικού οξέος 1M και τέλος 3 mL μεθανόλης.
9. Εφαρμογή κενού (>10 mm Hg) για ξήρανση της στήλης για 5 λεπτά.
10. Έκλυση των αναλυτών, με την προσθήκη εις διπλούν 2 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μίγματος οξικού αιθυλεστέρα: ισοπροπανόλης:αμμωνίας (85:15:3, v/v/v).
11. Εξάτμιση του συνολικού εκλούσματος μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂.
12. Παραγωγοποίηση με την προσθήκη 50 μL επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη 99% (HFBA) και 100 μL οξικού αιθυλεστέρα σε θερμοκρασία 50°C για 30 λεπτά.
13. Ψύξη των δειγμάτων και εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂.
14. Ανασύσταση των δειγμάτων με προσθήκη 50 μL οξικού αιθυλεστέρα, ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης για 15 δευτερόλεπτα και μεταφορά σε φιαλίδια που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
15. Τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση όγκου 1 μL στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS, με τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω στον Πίνακα 6.

Στα πραγματικά δείγματα εφαρμόστηκαν τα ανωτέρω στάδια με την παράλειψη του βήματος 3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ

Η επικύρωση (validation) της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2001), της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002), του ICH (International Conference on Harmonization) (ICH, 2005) και της EURACHEM (Eurachem, 2014). Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιελάμβανε τη μελέτη της εκλεκτικότητας (selectivity), της ειδικότητας (specificity) και της γραμμικότητας (linearity), τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (intraday precision), της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (interday precision), της ορθότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy), και της απόλυτης ανάκτησης (absolute recovery).

8.1 Εκλεκτικότητα

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι τυφλών βιολογικών δειγμάτων υαλοειδούς υγρού διαφορετικής προέλευσης και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από ενδογενή συστατικά του στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (FDA, 2001, Eurachem, 2014). Τα δείγματα κατεργάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

8.2 Ειδικότητα

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή μικτού διαλύματος εργασίας διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10 µg/mL. Το εν λόγω διάλυμα εργασίας περιείχε ουσίες ή μεταβολίτες αυτών που μπορεί να λαμβάνονται, νόμιμα ή παράνομα, από άτομα που λαμβάνουν αγωγή με αντικαταθλιπτικά φάρμακα και ενδέχεται να συνυπάρχουν στα υπό εξέταση μεταθανάτια δείγματα αυτών. Οι ουσίες αυτές, καθώς, επίσης, και οι μεταβολίτες που περιέχονταν στο διάλυμα ήταν οι παρακάτω: διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, αλπραζολάμη, παρακεταμόλη, βρωμαζεπάμη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη, φαινοβαρβιτόνη, λοραζεπάμη,

κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, λεβομεπρομαζίνη, ρισπεριδόνη, υδροξυριςπεριδόνη, αμισουλπιρίδη, κλοζαπίνη, χλωροπρομαζίνη, λεβομεπρομαζίνη, βιπεριδένη, ζολπιδέμη, τραμαδόλη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, λιδοκαΐνη, κεταμίνη, νορκεταμίνη, εφεδρίνη, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη, 11-nor- Δ^9 -τετραϋδροκανναβινοϊκό οξύ, φαινοβαρβιτάλη, βουπρενορφίνη, νορβουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6- μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης Επιπλέον, παρασκευάστηκαν έξι εμβολιασμένα πρότυπα βιολογικά δείγματα υαλοειδούς υγρού των παραπάνω προτύπων ουσιών τελικής συγκέντρωσης 500 ng/mL και χωρίς την προσθήκη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας τις αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου τους (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος τουλάχιστον κατά τρεις (LOD, $S/N > 3:1$) και δέκα φορές (LOQ, $S/N > 10:1$), αντίστοιχα (ICH, 2005).

8.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης έξι σημείων σε 4 διαφορετικές ημέρες για το υαλοειδές υγρό. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης που επελέγησαν για αυτό παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης ($y=ax+\beta$) των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας $1/x^2$, όπου το x αντιστοιχεί στην ονομαστική (θεωρητική) τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL, ενώ το y αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου. Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης και έπρεπε να ισχύει ότι $R^2 \geq 0.98$ (ICH, 2005, Eurachem, 2014).

8.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (%E_r) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

όπου x είναι η τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και μ η αντίστοιχη αναμενόμενη συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως ±15% για όλα τα επίπεδα και έως ±20% για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας, intraday precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (δια των ημερών, interday precision), ελέγχθηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό (συγκέντρωσης 3πλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) επίπεδο. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν για το υαλοειδές υγρό αναφέρονται στον Πίνακα 4. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις τέσσερις ημέρες ανάλυσης (συνολικά 24 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) για το υαλοειδές υγρό σύμφωνα με τη μέθοδο. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογιζόταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος της μεθόδου και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε διαφορετικές ημέρες. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας (FDA, 2001). Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει τη μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκτιμήθηκε και από το % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης (Eurachem, 2014).

8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης και υπολογιζόταν η μέση τιμή των μετρήσεων για τα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης. Η ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, αποτελεί μέτρο του συστηματικού σφάλματος μίας μεθόδου και εκτιμήθηκε από το % σχετικό σφάλμα (%Er), που υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

για δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και στο σύνολο των ημερών, αντίστοιχα. Το %Er δείχνει πόσο απέχει η τιμή (x) των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από την ονομαστική (θεωρητική) τιμή (μ), δηλαδή την συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του %Er, που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

8.8 Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τα υπό προσδιορισμό αντικαταθλιπτικά φάρμακα εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Επίσης, υπολογίστηκε η

απόλυτη ανάκτηση του εσωτερικού προτύπου. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό, μεσαίο και υψηλό με βάση τις αναπτυχθείσες μεθόδους. Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου, γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση έξι μιγμάτων των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που μελετήθηκαν σε μεθανόλη με αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά την παραγωγοποίηση. Η απόλυτη ανάκτηση υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απόλυτη Ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου:

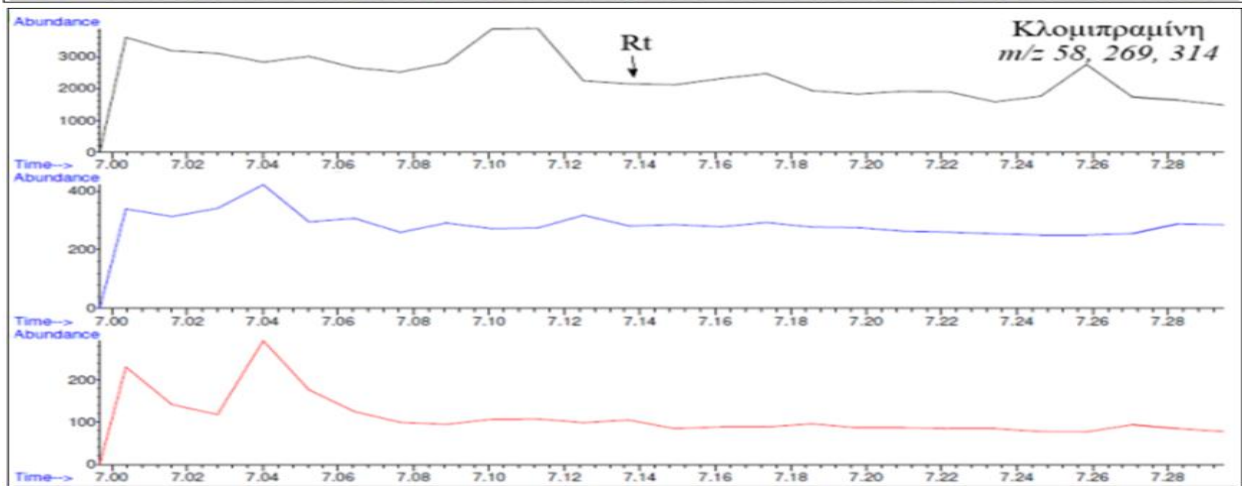
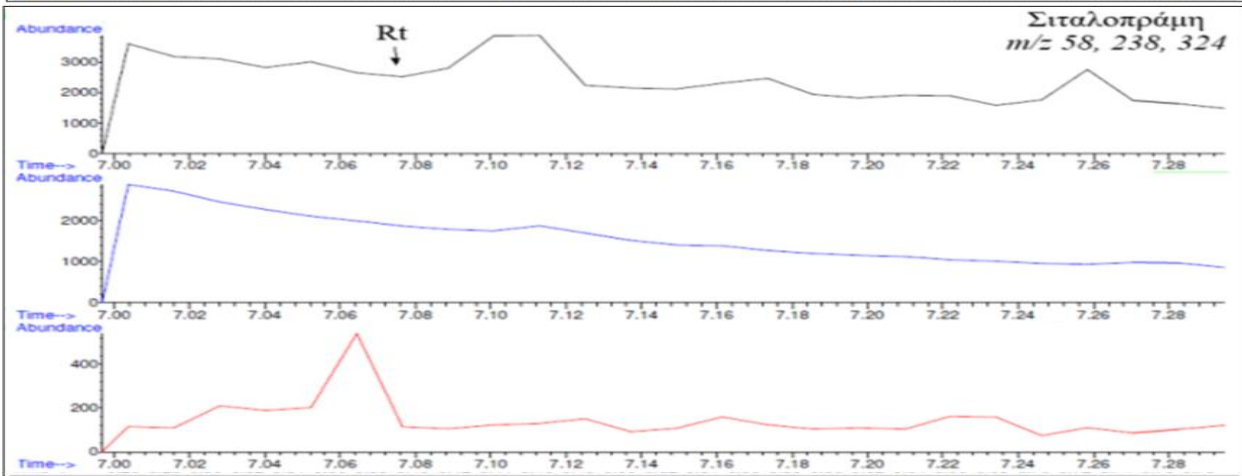
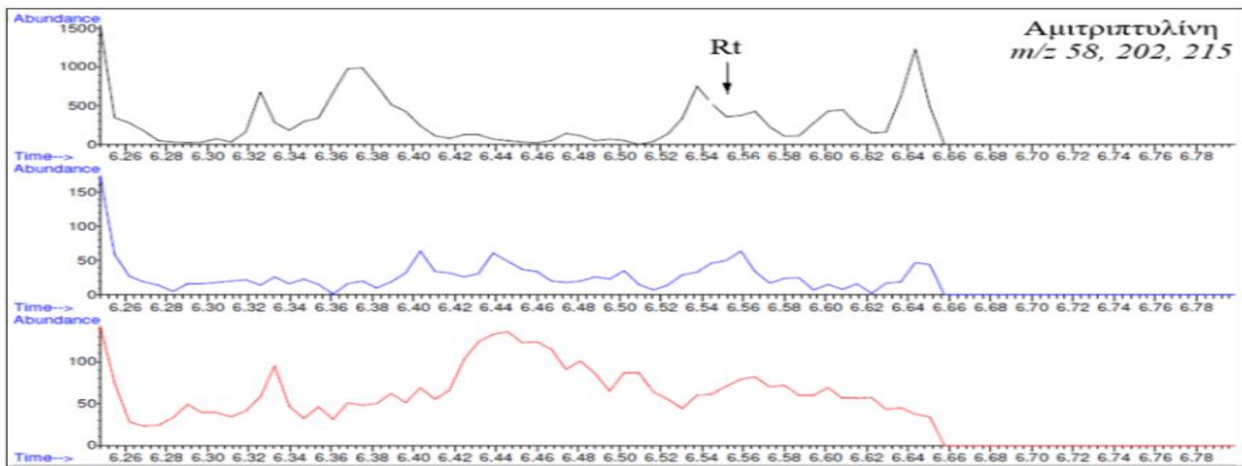
E_1 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και παραγωγοποίηση, και E_2 είναι το μέσο εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

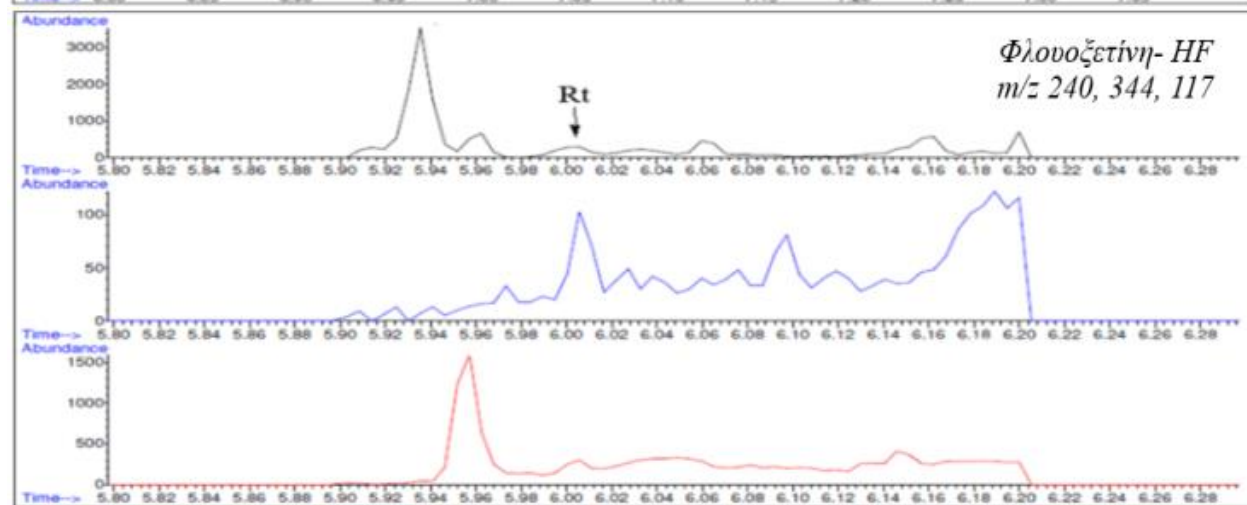
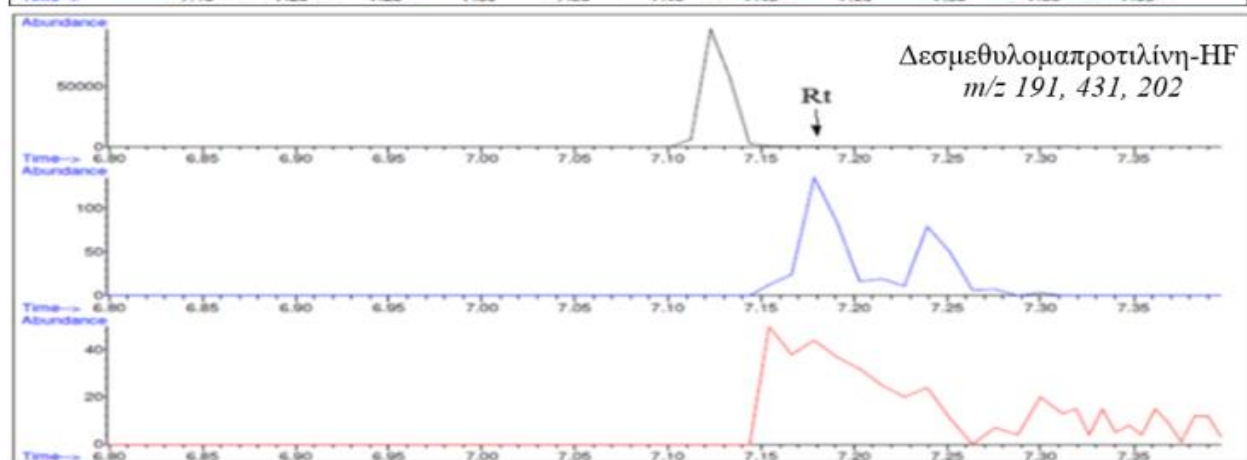
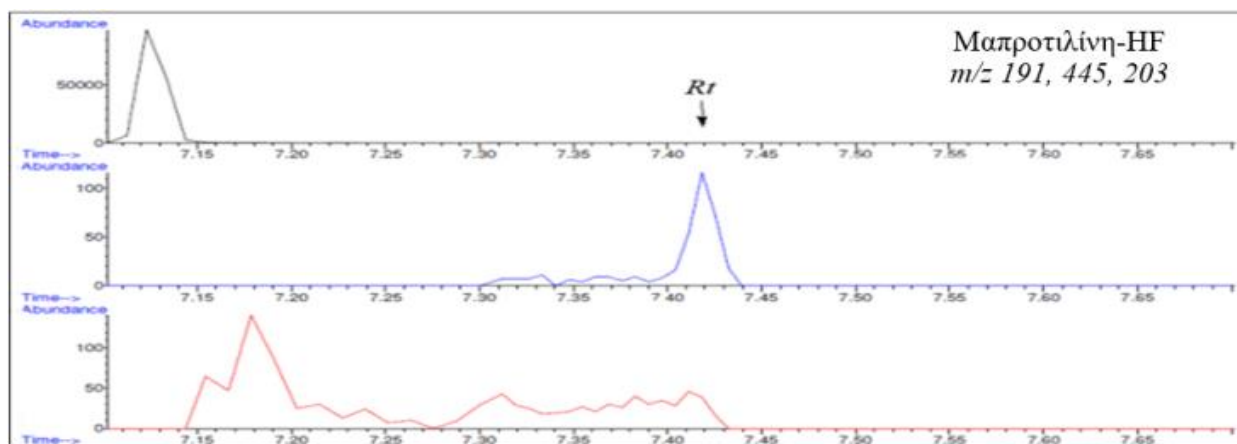
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ

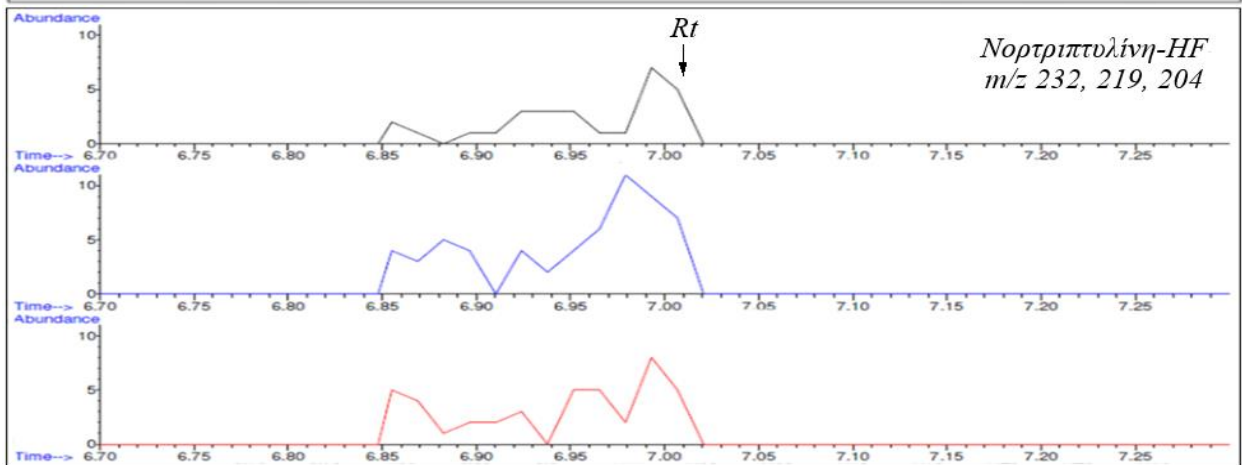
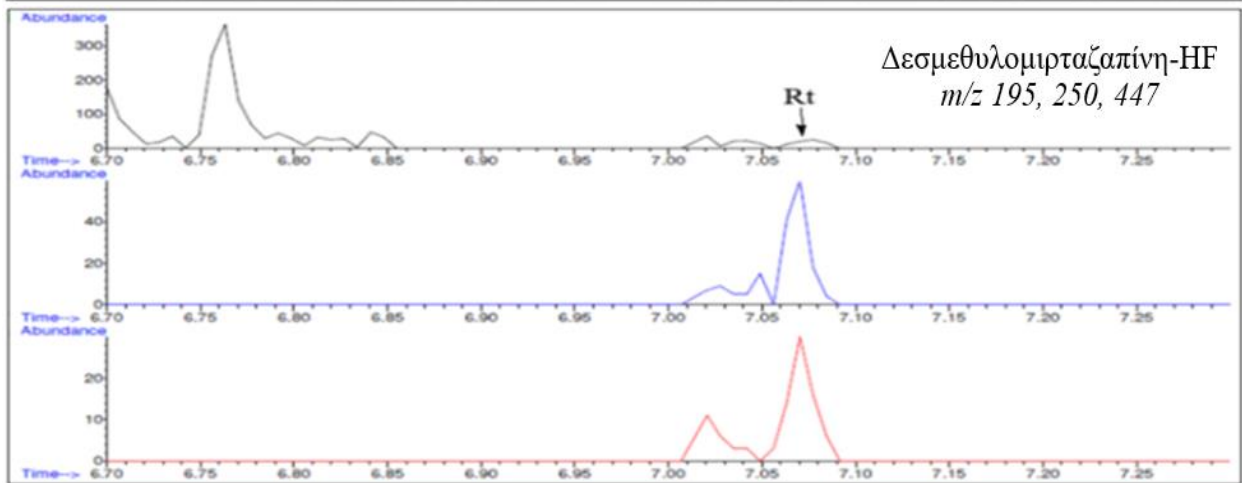
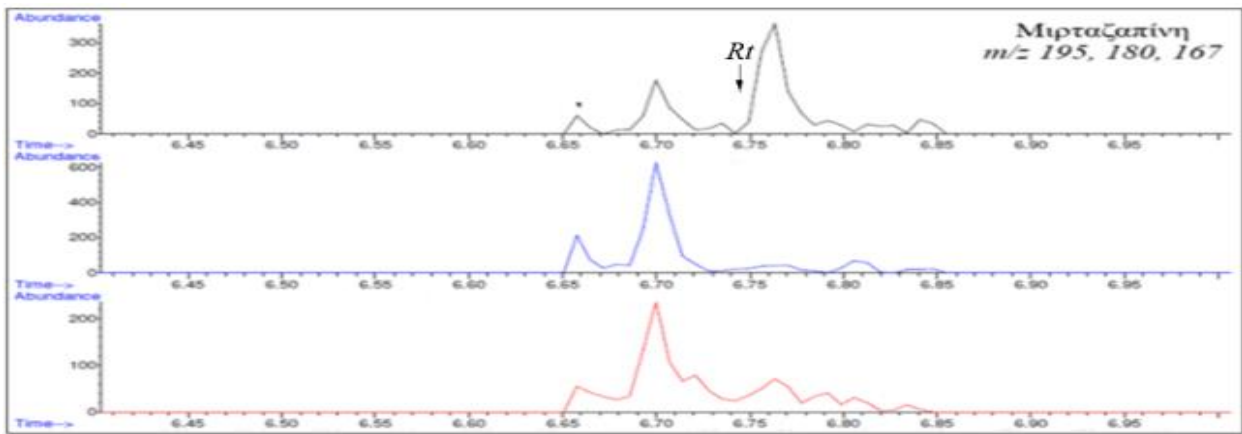
Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματική εργασία (αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαζίνη και δεσμεθυλοβενλαφαζίνη), καθώς και το εσωτερικό πρότυπο (προτριπτυλίνη) σύμφωνα με τη μεθοδολογία, απομονώνονταν από το υαλοειδές υγρό μετά από εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες Bond Elut LRC Certify. Στη συνέχεια, τα εκλούσματα που περιείχαν τους αναλύτες εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και γινόταν παραγωγοποίηση με μίγμα 50 μL επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη 99% (HFBA) και 100 μL οξικού αιθυλεστέρα σε θερμοκρασία 50⁰C για 30 λεπτά. Μετά από εξάτμιση του δείγματος μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και ανασύσταση με 50 μL οξικού αιθυλεστέρα, γινόταν έγχυση 1 μL από το δείγμα σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Η μέθοδος προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων έχει περιγραφεί αναλυτικά στο κεφάλαιο 7.3.

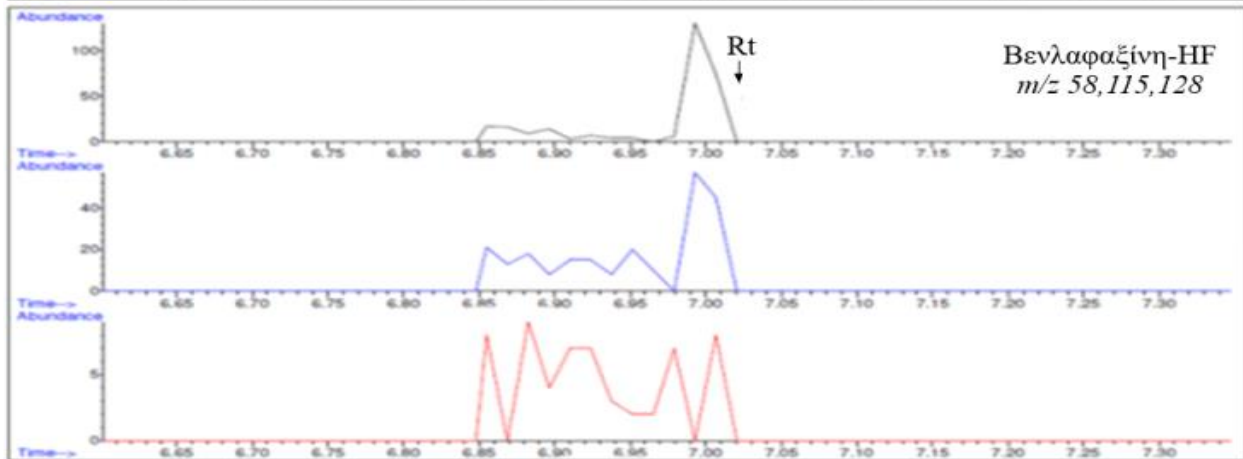
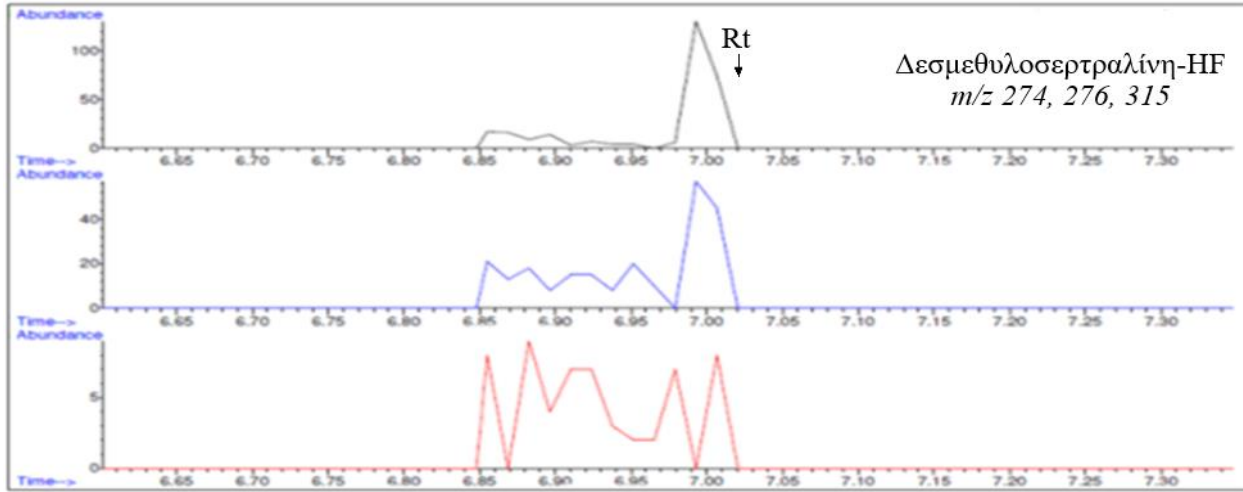
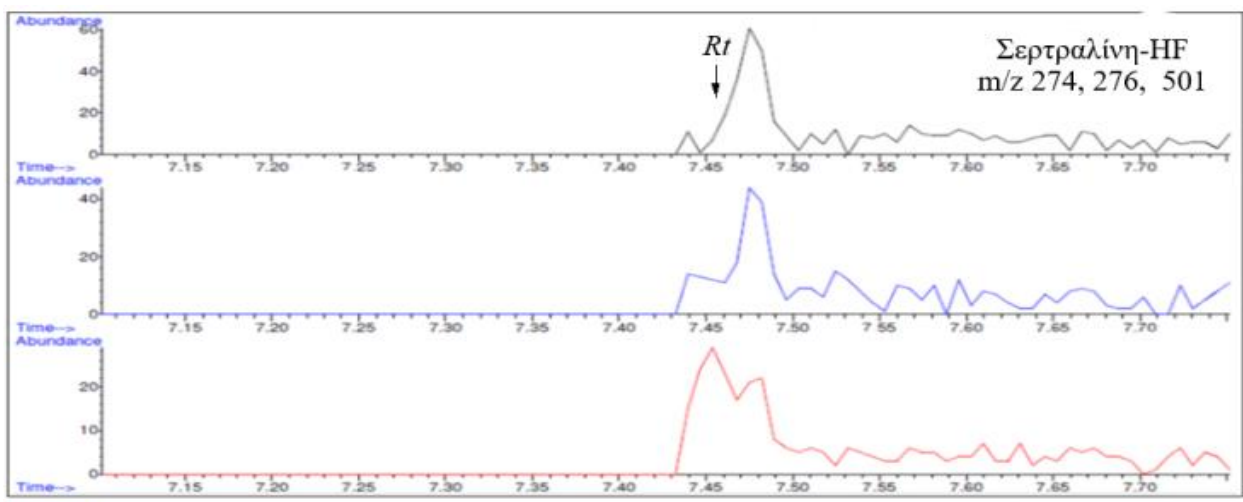
9.1 Εκλεκτικότητα

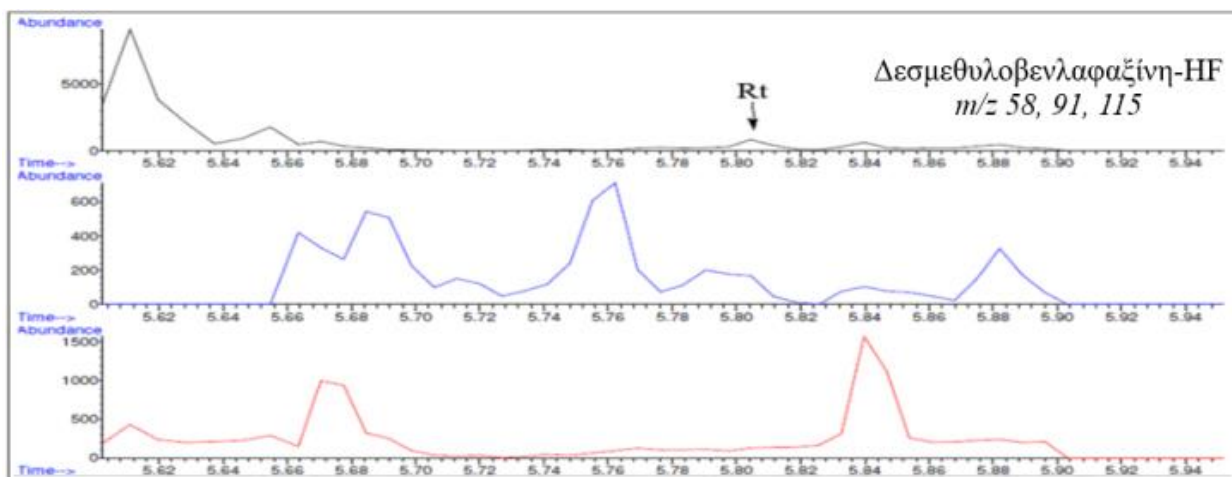
Έξι τυφλά δείγματα υαλοειδούς υγρού τα οποία χρησιμοποιήθηκαν από έξι νεκροψίες ανθρώπων που δεν λάμβαναν αντικαταθλιπτική αγωγή, κατεργάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες, όπως αυτές έχουν περιγραφεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο 7 της μεθόδου προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό, χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από τα συστατικά του υαλοειδούς υγρού στους χρόνους ανάλυσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους. Στο Σχήμα 15, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων θραυσμάτων των αναλυτών που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα υαλοειδούς υγρού.











Σχήμα 15. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων θραυσμάτων για κάθε αντικαταθλιπτικό φάρμακο που ελήφθησαν σε ένα τυφλό δείγμα υαλοειδούς υγρού

9.2 Ειδικότητα

Αρχικά, όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 8.2, από το μικτό διάλυμα εργασίας 39 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10.0 $\mu\text{g/mL}$, που ενδέχεται να συνυπάρχουν σε δείγματα υαλοειδούς υγρού θανόντων που ελάμβαναν αντικαταθλιπτική αγωγή, έγινε εμβολιασμός έξι τυφλών δειγμάτων υαλοειδούς υγρού με 50 μL , οπότε η τελική συγκέντρωση για κάθε ουσία ήταν 500.0 ng/mL . Τα εν λόγω εμβολιασθέντα δείγματα υαλοειδούς υγρού, από τα οποία απουσίαζαν τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο σε υαλοειδές υγρό, ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους ανάσχεσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που να οφειλόntonταν στις εμβολιασμένες ουσίες. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάσχεσης των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

9.3 Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

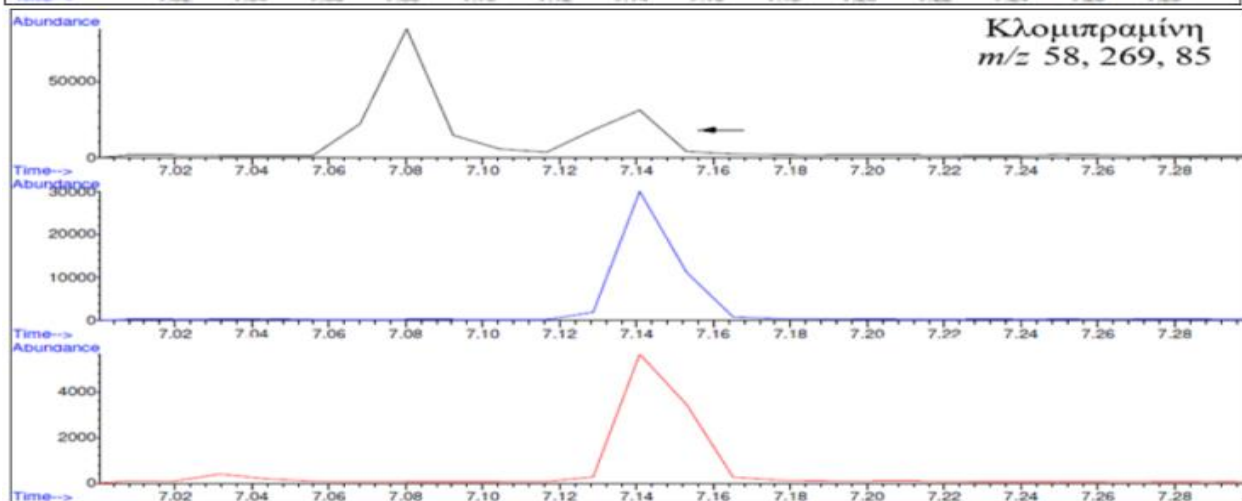
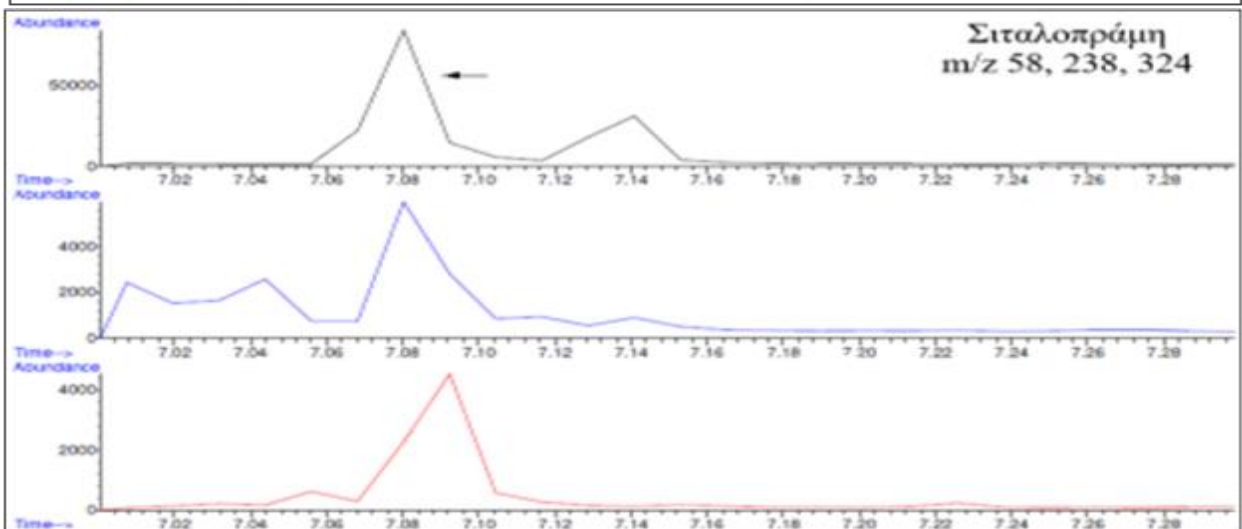
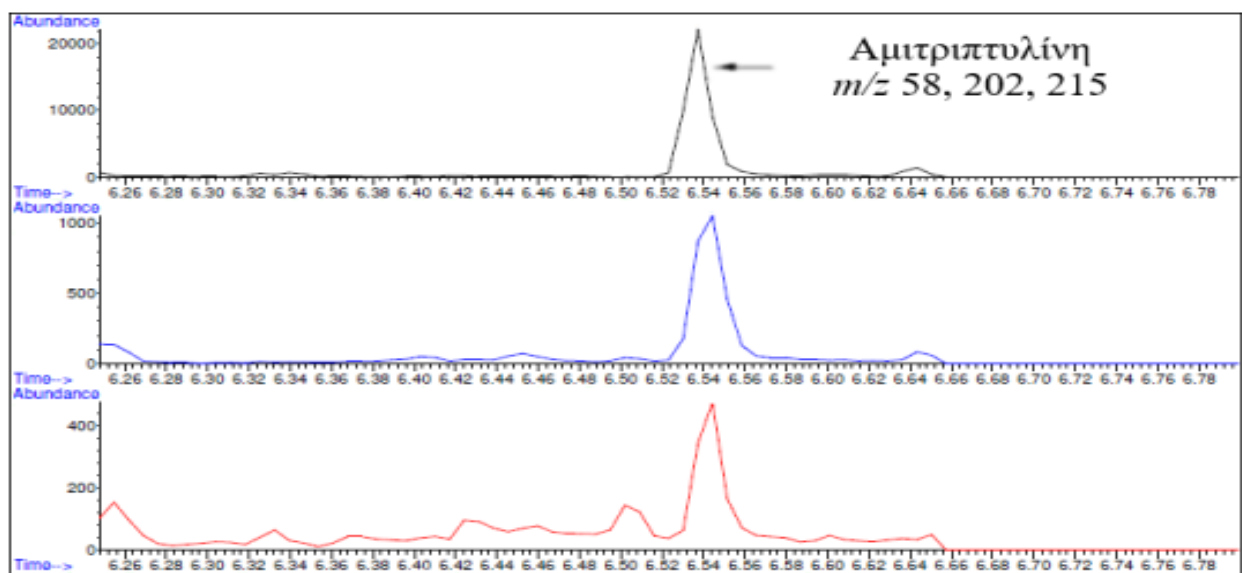
Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, υπολογίστηκαν με βάση το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος υαλοειδούς υγρού στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N > 3:1$) και βρέθηκε να είναι 1.5 ng/mL για τον κάθε αναλύτη.

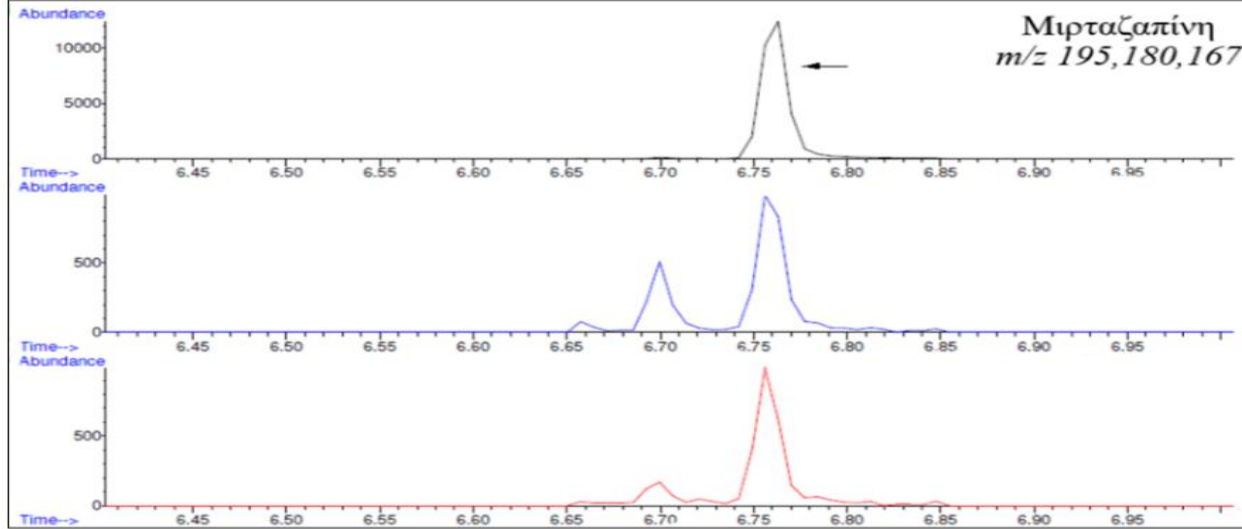
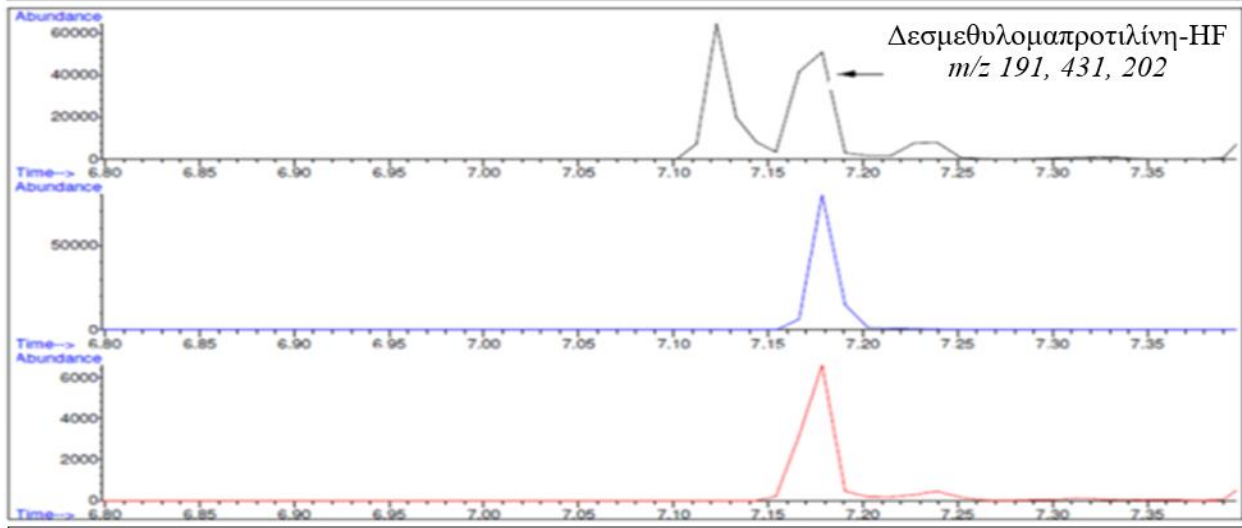
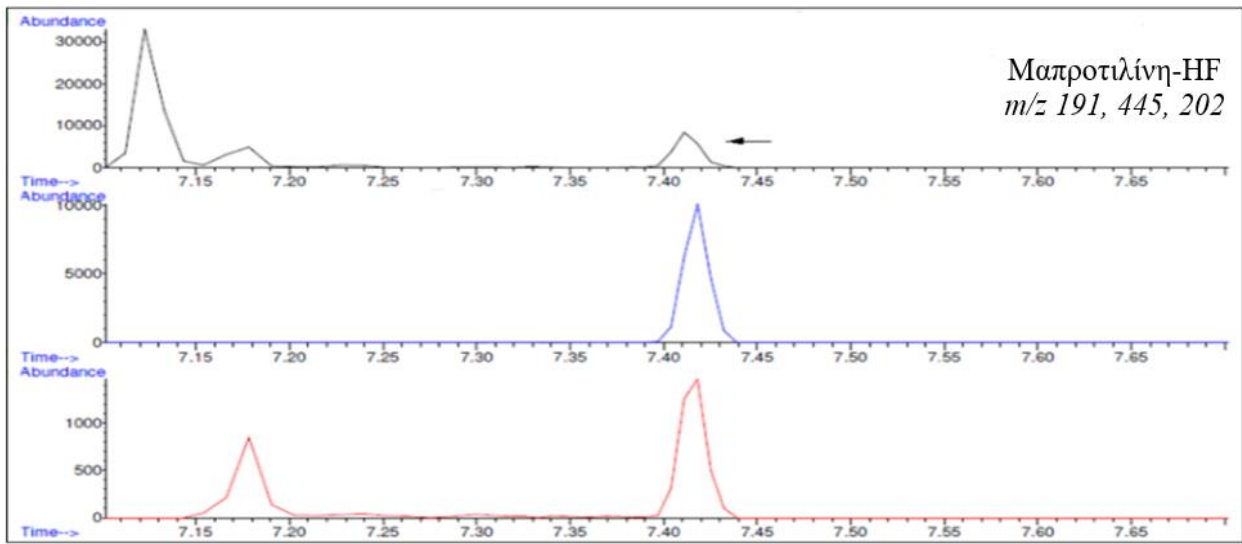
Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, υπολογίστηκαν (Πίνακας 7), με βάση το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος υαλοειδούς υγρού στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 10 ($S/N > 10:1$) και βρέθηκε να είναι 5.00 ng/mL για το σύνολο των υπό προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Για τον υπολογισμό των τιμών αυτών, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα υαλοειδούς υγρού στην παραπάνω συγκέντρωση για τους αναλύτες και 6 τυφλά δείγματα υαλοειδούς υγρού.

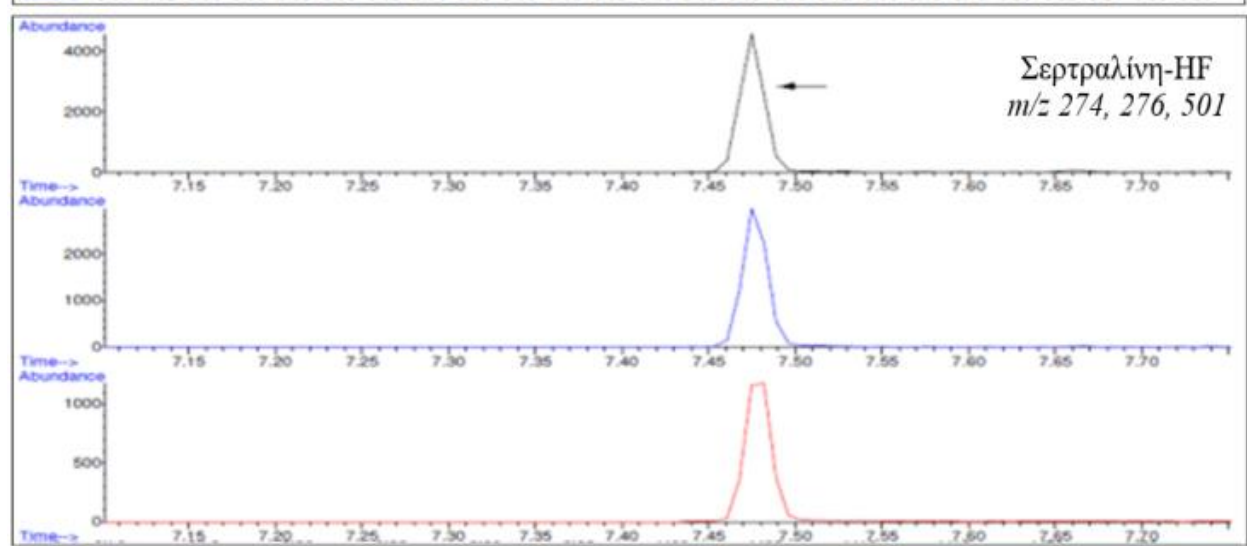
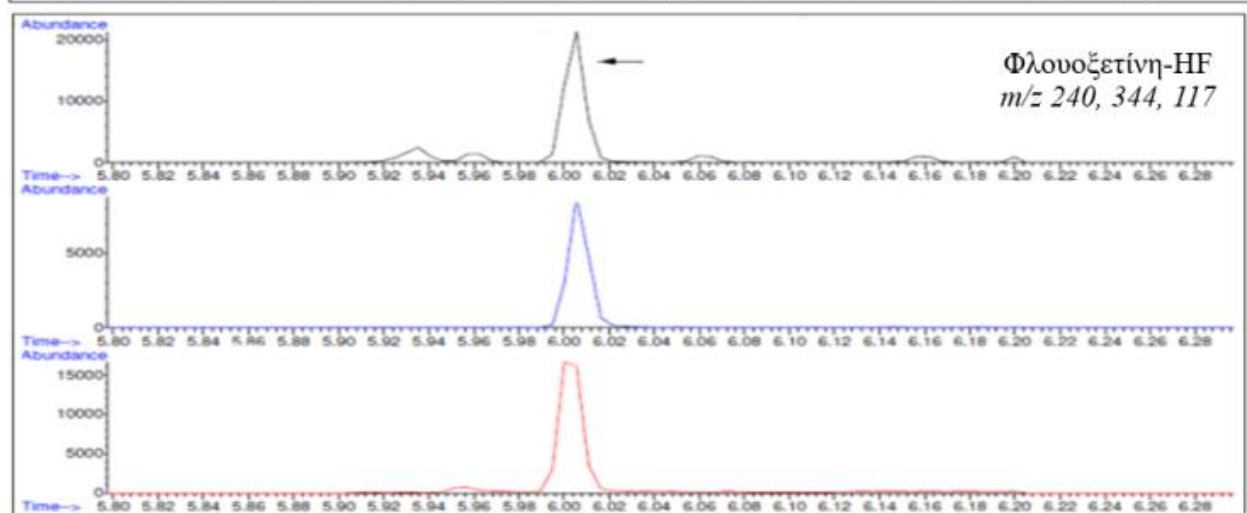
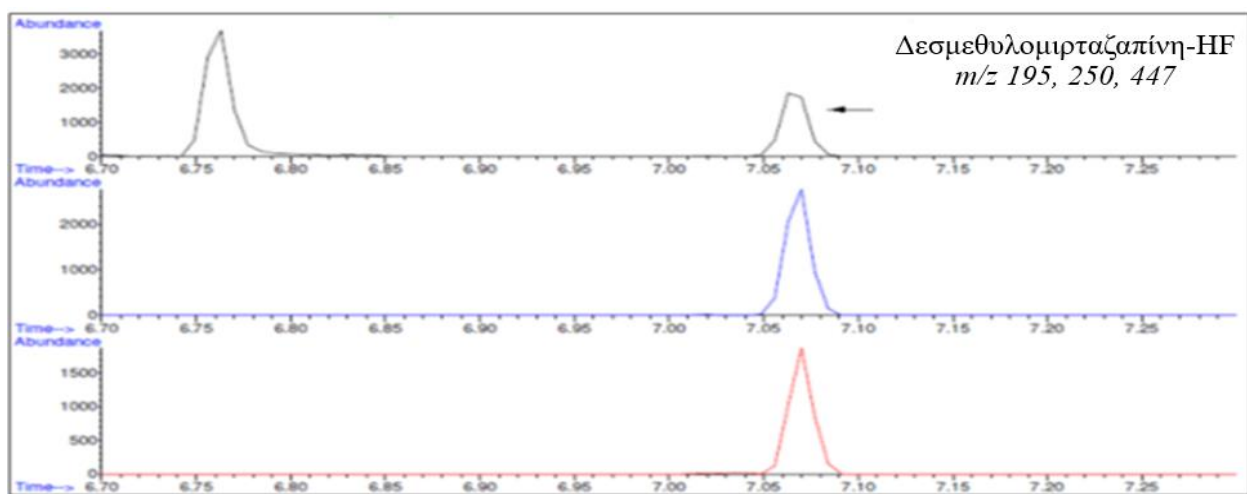
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων θραυσμάτων των αναλυτών, που ελήφθησαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα υαλοειδούς υγρού στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 16.

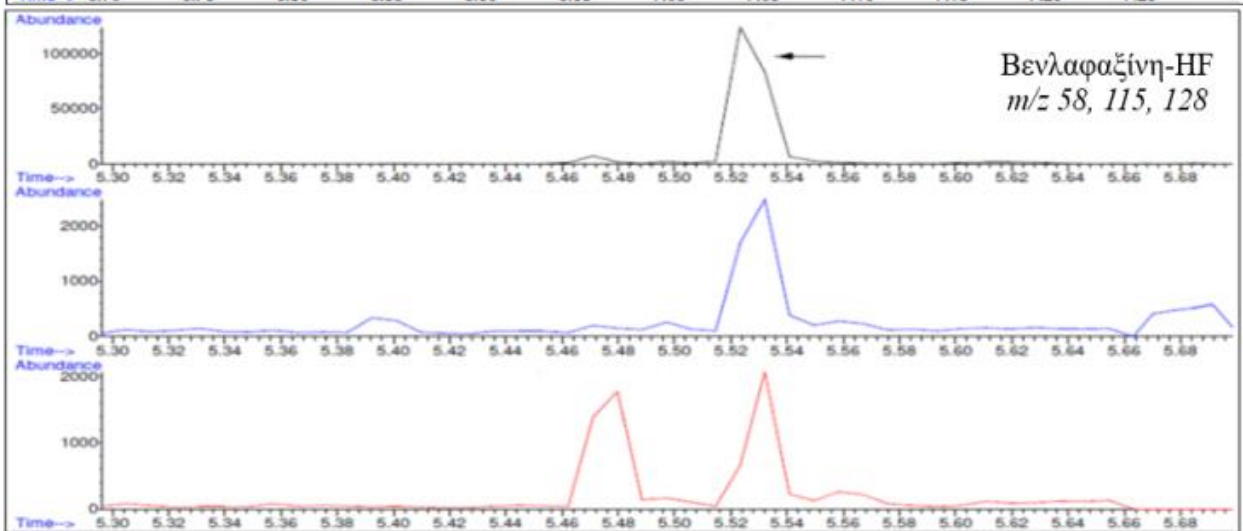
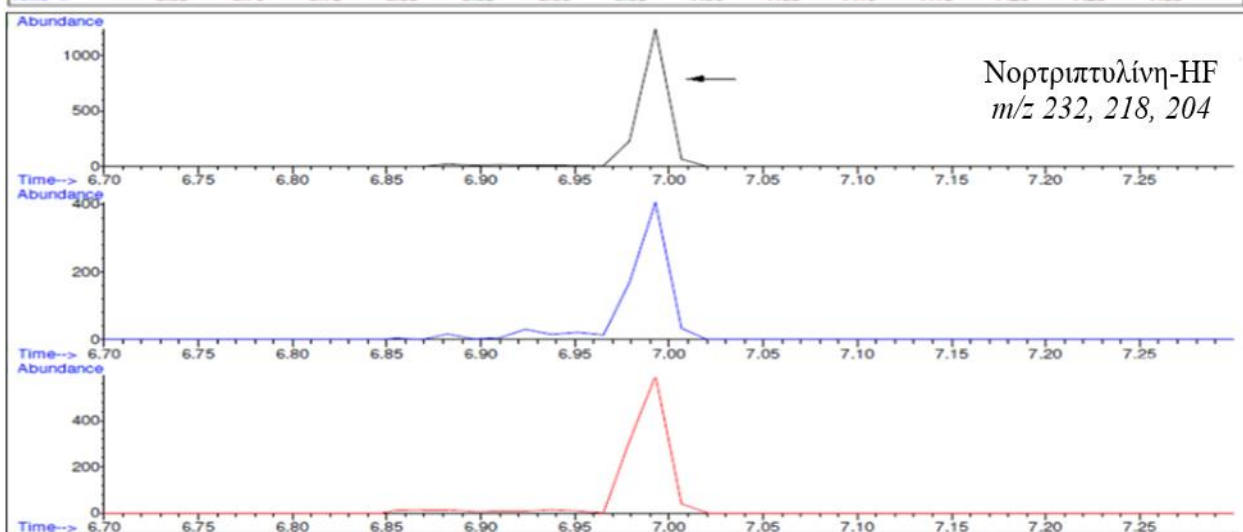
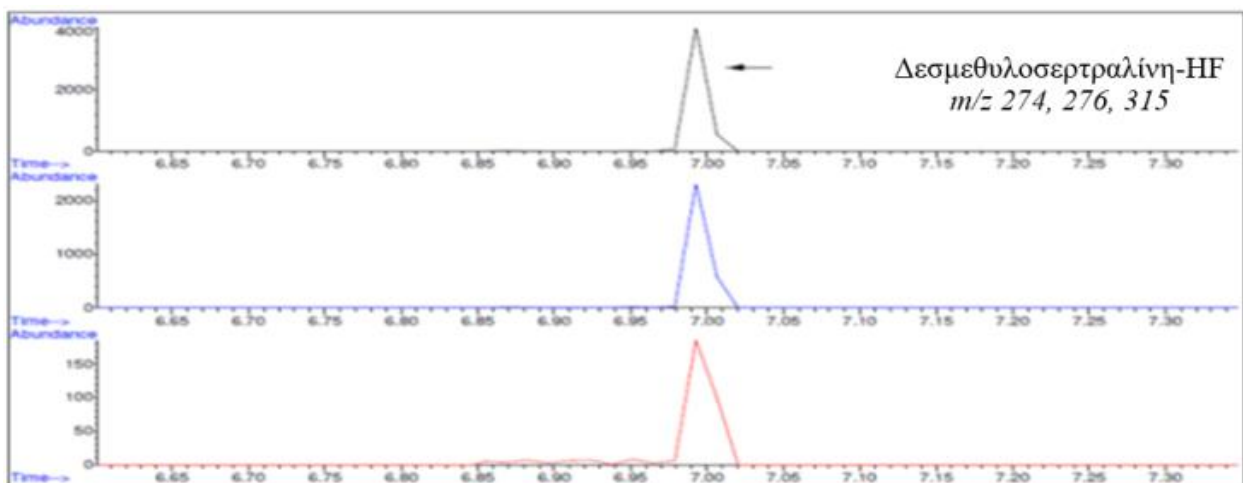
Πίνακας 7. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό.

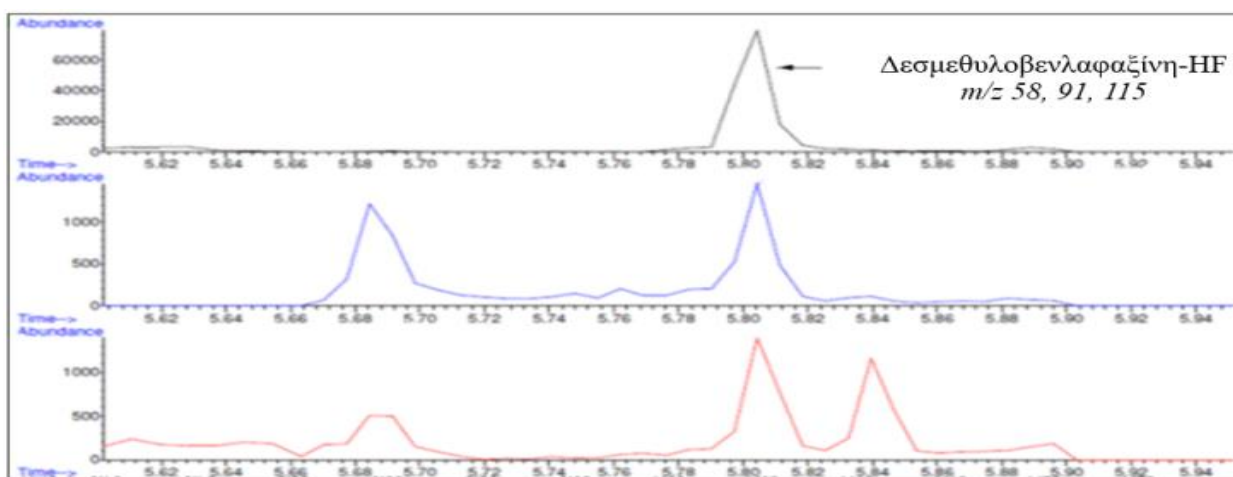
Φάρμακο	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	S/N>3:1	S/N>10:1
Αμιτριπτυλίνη	1.5	5.0
Σιταλοπράμη	1.5	5.0
Κλομιπραμίνη	1.5	5.0
Νορτριπτυλίνη	1.5	5.0
Φλουοξετίνη	1.5	5.0
Μαπροτιλίνη	1.5	5.0
Δεσμεθυλομαπροτιλίνη	1.5	5.0
Μιρταζαπίνη	1.5	5.0
Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	1.5	5.0
Σερτραλίνη	1.5	5.0
Δεσμεθυλοσερτραλίνη	1.5	5.0
Βενλαφαξίνη	1.5	5.0
Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	1.5	5.0











Σχήμα 16. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων θραυσμάτων των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, που ελήφθησαν σε ένα εμβολιασμένο δείγμα υαλοειδούς υγρού στο κατόπιο όριο ποσοτικοποίησης.

9.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές ημέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων, που παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση. Οι συγκεντρώσεις των 6 σημείων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για την κάθε ουσία, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον Πίνακα 3. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής $y=ax+b$, όπου: y είναι ο λόγος επιφάνειας κορυφής του αναλύτη προς την επιφάνεια κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου και x η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε υαλοειδές υγρό για τις τέσσερις ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 8-20 για τις αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νοτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σετραλίνη, δεσμεθυλοσετραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό (%) σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης αποτέλεσε κριτήριο της ενδοοργανισμικής αναπαραγωγικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου και ήταν για όλες τις ουσίες $\leq 5\%$. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για το εύρος συγκεντρώσεων στο υαλοειδές υγρό από 5.00 έως 500.0 ng/mL για το σύνολο των

μελετηθέντων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων και για όλους τους αναλύτες σε όλες τις σειρές ανάλυσης ($R^2 \geq 0.990$).

Πίνακας 8. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για την αμιτριπυλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=0.0235x+0.0381$	0.994
2 ^η	$y=0.0242x+0.0369$	0.997
3 ^η	$y=0.0239x-0.0137$	0.999
4 ^η	$y=0.0244x+0.0274$	0.999
Μέση Εξίσωση	$y=0.02363(\pm 0.0001)x-0.0096(\pm 0.0015)$	0.997
% RSD	2.4	

Πίνακας 9. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη σιταλοπράμη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=0.00613x+0.00409$	1
2 ^η	$y=0.00613x+0.00416$	0,990
3 ^η	$y=0.00647x+0.00212$	0.992
4 ^η	$y=0.00628x+0.00226$	0.993
Μέση Εξίσωση	$y=0.00625(\pm 0.0002)x+0.00316(\pm 0.0011)$	0.994
% RSD	2.6	

Πίνακας 10. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για την κλομιπραμίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=0.00332x+0.00908$	0.993
2 ^η	$y=0.00329x+0.00743$	0.994
3 ^η	$y=0.00314x+0.00937$	0.992
4 ^η	$y=0.00345x+0.00622$	0.997
Μέση Εξίσωση	$y=0.0033(\pm 0.00056)x+0.00803(\pm 0.0852)$	0.994
% RSD	3.9	

Πίνακας 11. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για την νορτριπυλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0396x-0.0142$	0.999
2 ^η	$y=0.0377x-0.0128$	0.998
3 ^η	$y=0.0388x-0.00846$	0.997
4 ^η	$y=0.0397x-0.00066$	0.999
Μέση Εξίσωση	$y=0.03895(\pm 0.0009)x-0.0048(\pm 0.01073)$	0.998
%RSD	2.4	

Πίνακας 12. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη φλουοξετίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0213x-0.00323$	0.992
2 ^η	$y=0.0202x-0.00740$	0.992
3 ^η	$y=0.0208x+0.00739$	0.997
4 ^η	$y=0.0213x-0.0130$	0.998
Μέση Εξίσωση	$y=0.0209(\pm 0.0005)x-0.00406(\pm 0.0086)$	0.995
%RSD	2.5	

Πίνακας 13. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για την μαπροτιλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0138x-0.00665$	0.999
2 ^η	$y=0.0142x-0.00420$	1
3 ^η	$y=0.0153x+0.00141$	0.99
4 ^η	$y=0.0144x+0.00158$	0.999
Μέση Εξίσωση	$y=0.0144(\pm 0.0008)x+0.00159(\pm 0.0114)$	0.997
%RSD	4.4	

Πίνακας 14. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη δεσμεθυλομαπροτιλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0123x+0.00348$	0.995
2 ^η	$y=0.0118x-0.00187$	0.999
3 ^η	$y=0.0116x+0.0304$	0.990
4 ^η	$y=0.0113x+0.0268$	0.993
Μέση Εξίσωση	$y=0.0118(\pm 0.0003)x+0.0147(\pm 0.0177)$	0.997
%RSD	3.6	

Πίνακας 15. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για την μινταζαπίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.00695x+0.0163$	0.995
2 ^η	$y=0.00681x+0.0556$	0.998
3 ^η	$y=0.00659x+0.0613$	0.996
4 ^η	$y=0.00690x+0.0423$	0.991
Μέση Εξίσωση	$y=0.00681(\pm 0.000159)x+0.0439(\pm 0.02003)$	0.995
%RSD	2.3	

Πίνακας 16. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη δεσμεθυλομινταζαπίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.00430x-0.00264$	0.998
2 ^η	$y=0.00419x-0.00263$	0.997
3 ^η	$y=0.00449x+0.00507$	0.995
4 ^η	$y=0.00468x+0.00172$	0.996
Μέση Εξίσωση	$y=0.00442(\pm 0.000216)x+0.00380(\pm 0.00374)$	0.997
%RSD	4.9	

Πίνακας 17. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη σερτραλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.00782x-0.00201$	1
2 ^η	$y=0.00813x+0.00187$	0.998
3 ^η	$y=0.00847x+0.00783$	0.996
4 ^η	$y=0.00812x+0.00812$	0.998
Μέση Εξίσωση	$y=0.00813(\pm 0.000267)x+0.00400(\pm 0.0049)$	0.998
% RSD	3.3	

Πίνακας 18. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη δεσμεθυλοσερτραλίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0104x-0.00119$	0.998
2 ^η	$y=0.0108x+0.0129$	0.993
3 ^η	$y=0.0115x+0.00404$	0.999
4 ^η	$y=0.0104x-0.00454$	1
Μέση Εξίσωση	$y=0.0110(\pm 0.0005)x+0.00280(\pm 0.0076)$	0.998
% RSD	4.8	

Πίνακας 19. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη βενλαφαζίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0731x+0.262$	0.990
2 ^η	$y=0.0658x+0.205$	0.996
3 ^η	$y=0.0683x+0.0234$	0.993
4 ^η	$y=0.0721x+0.0336$	0.997
Μέση Εξίσωση	$y=0.0698(\pm 0.0034)x+0.131(\pm 0.1207)$	0,994
% RSD	4.9	

Πίνακας 20. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τέσσερις ημέρες για τη δεσμεθυλοβενλαφαζίνη, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0.0229x+0.0337$	0.993
2 ^η	$y=0.0231x+0.0184$	0.993
3 ^η	$y=0.0222x-0.00653$	0.998
4 ^η	$y=0.0226x+0.0298$	0.998
Μέση Εξίσωση	$y=0.0227(\pm 0.0004)x+0.0181(\pm 0.0181)$	0.996
%RSD	1.5	

9.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης υαλοειδούς υγρού σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% Er) για την κάθε ημέρα παρουσιάζονται στους Πίνακες 21-33 για τις αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νοτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαζίνη και δεσμεθυλοβενλαφαζίνη, αντίστοιχα. Οι τιμές των αποτελεσμάτων ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ (στο LOQ $\pm 20\%$).

Πίνακας 21. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την αμιτριπυλίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250	500
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.29	10.75	28.22	105.20	244.65	483.64
	%Er	5.80	7.50	-5.93	5.20	-2.14	-3.27
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.26	9.62	32.54	100	248.93	508.70
	%Er	5.20	-3.80	8.47	0.00	-0.43	1.74
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.18	9.82	30.00	105.77	280.01	452.74
	%Er	3.6	-1.80	0.00	5.77	12.00	-7.45
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.24	10.00	27.05	93.47	261.94	498.24
	%Er	4.80	0.00	-9.83	-6.53	4.78	-0.35

Πίνακας 22. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη σιταλοπράμη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.74	10.95	9.50	32.80	99.98	240.77
	%E _r	-5.20	9.50	9.33	-0.02	-3.69	2.43
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.09	9.22	30.80	94.84	245.25	495.67
	%E _r	1.80	-7.80	2.67	-5.16	-1.90	-0.87
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.25	10.37	30.00	92.86	254.81	569.80
	%E _r	5.00	3.70	0.00	-7.14	1.92	13.96
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.48	8.55	28.59	100.00	255.95	500.00
	%E _r	9.50	-14.5	-4.70	0.00	2.38	0.00

Πίνακας 23. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την κλοπιπραμίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.06	10.23	29.63	106.66	243.68	487.98
	%E _r	1.20	2.30	-1.23	6.66	-2.53	-2.40
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.36	9.42	28.35	93.21	232.95	509.75
	%E _r	7.20	-5.80	-5.50	-6.79	-6.82	1.95
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.01	9.76	31.00	90.47	252.64	496.83
	%E _r	0.20	-2.40	3.33	-9.53	1.06	-0.63
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.79	10.66	29.30	92.79	253.24	513.94
	%E _r	-4.20	6.60	-2.33	-1.41	1.30	2.79

Πίνακας 24. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την νοττριπυλίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.01	9.34	28.71	94.74	255.10	432.93
	%E _r	0.20	-6.60	-4.30	-5.26	2.04	-13.41
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.50	9.02	29.03	92.49	250.33	467.69
	%E _r	-10.0	-9.80	-3.23	-7.51	0.13	-6.46
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.58	10.84	31.10	82.38	236.31	500,01
	%E _r	-8.40	8.40	3.67	-17.62	-5.48	0.01
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.92	10.09	28.93	100	230.53	466.00
	%E _r	-1.60	0.90	-3.57	0.00	-7.79	-6.80

Πίνακας 25. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη φλουοξετίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.01	9.40	27.38	98.47	251.13	454.68
	%E _r	2.00	2.30	-3.63	1.06	1.11	-4.75
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.10	10.23	28.91	101.06	252.78	476.23
	%E _r	2.00	2.30	-3.63	1.06	1.11	-4.75
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.36	9.37	30.76	106.04	249.60	485.73
	%E _r	7.20	-6.30	2.53	6.04	-0.16	-2.85
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.93	10.74	31.21	98.15	236.07	488.76
	%E _r	-1.40	7.40	4.03	-1.85	-5.57	-2.25

Πίνακας 26. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την μαπροτιλίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.08	10.15	28.40	99.03	243.36	456.76
	%E _r	1.60	1.50	-5.33	-0.97	-2.66	-8.65
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.98	9.77	29.35	101.08	251.90	504.69
	%E _r	-0.40	-2.30	-2.17	1.08	0.76	0.94
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.80	10.18	29.44	108.89	248.71	463.52
	%E _r	-4.00	1.80	-1.87	8.89	-0.52	-7.30
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.11	10.39	29.78	95.12	238.54	456.14
	%E _r	2.20	3.90	-0.73	-4.88	-4.58	-8.77

Πίνακας 27. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη δεσμεθυλομαπροτιλίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.09	10.08	28.17	108.50	239.26	500
	%E _r	1.80	0.80	-6.10	8.50	-4.30	0.00
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.88	9.12	31.20	94.15	234.09	413.04
	%E _r	-2.80	-8.80	4.00	-5.85	-6.36	-17.39
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.64	10.29	34.23	100	240.86	501.35
	%E _r	-7.20	2.90	14.10	0.00	-3.66	0.27
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.04	10.92	27.10	100	213.95	446.96
	%E _r	0.80	9.20	-9.67	0.00	-14.42	-10.61

Πίνακας 28. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την μινταζαπίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.21	10.14	29.88	107.43	242.69	513.94
	%E _r	4.20	1.40	-0.40	7.43	-2.92	2.79
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.85	9.20	34.60	92.33	282.59	508.25
	%E _r	-3.00	-8.00	15.33	-7.67	13.04	1.65
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.88	10.35	30.00	104.73	247.94	497.63
	%E _r	-2.40	3.50	0.00	4.73	-0.82	-0.47
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.28	10.00	30.00	98.95	258.58	478.55
	%E _r	5.60	0.00	0.00	-1.05	3.43	-4.29

Πίνακας 29. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη δεσμεθλομινταζαπίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.75	9.72	30.32	101.41	240.24	480.09
	%E _r	-5.00	-2.80	1.07	1.41	-3.90	-3.98
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.72	10.69	29.79	92.86	239.26	457.77
	%E _r	-5.60	6.90	-0.70	-7.14	-4.30	-8.45
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.15	10.74	30.00	96.19	268.14	489.01
	%E _r	3.00	7.40	0	-3.81	7.26	489.01
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.01	9.98	30.00	104.78	266.74	476.70
	%E _r	0.20	-0.20	0	4.78	6.70	-4.66

Πίνακας 30. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη σερτραλίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.12	9.78	28.04	100.81	247.60	471.59
	%E _r	2.4	-2.20	-6.53	0.81	-0.96	-5.68
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.98	10.04	28.71	96.50	250.50	500
	%E _r	-0.4	0.4	-4.30	-3.50	0.20	0
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.92	10.85	32.09	105.46	237.84	468.10
	%E _r	-1.60	8.50	6.97	5.46	-4.86	-6.38
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.16	10.15	29.28	94.20	252.44	486.62
	%E _r	3.20	1.50	-2.40	-5.80	0.98	-2.68

Πίνακας 31. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη δεσμεθυλοσερτραλίνη σε υαλοειδές υγρό.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.78	10.91	30.47	100.46	240.56	445.03
	%E _r	-4.4	9.10	1.57	0.46	-3.78	-10.99
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.01	9.58	31.69	94.07	257.42	513.51
	%E _r	0.20	-4.20	5.63	-5.93	2.97	2.70
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.26	11.26	33.70	113.50	268,43	486.51
	%E _r	5.20	12.60	12.33	13.50	7.37	-2.70
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.80	10.41	34.11	119.49	240.55	510.58
	%E _r	-4.00	4.10	13.70	19.49	-3.78	2.12

Πίνακας 32. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την βενλαφαξίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.83	9.84	31.21	99.96	254.74	500.44
	%E _r	-3.40	-1.60	4.03	-0.04	1.90	0.09
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.19	10.87	29.01	93.73	242.69	489.74
	%E _r	3.80	8.70	-3.30	-6.27	-2.92	-2.05
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.74	9.88	28.13	102.27	254.47	500.79
	%E _r	-5.20	-1.20	-6.23	2.27	1.79	0.16
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.14	10.28	28.64	111.03	264.91	471.43
	%E _r	2.80	2.80	-4.53	11.03	5.96	-5.71

Πίνακας 33. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη δεσμεθυλοβενλαφαξίνη.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	5	10	30	100	250
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.93	10.75	30.81	103.50	242.27	458.72
	%E _r	-1.4	7.5	2.7	3.5	-3.09	-8.26
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.18	9.20	29.59	97.36	256.16	488.80
	%E _r	3.6	-8.00	-1.37	-2.64	2.46	-2.24
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	5.47	9.33	29.96	111.80	249.27	517.43
	%E _r	9,4	-6.7	-0.13	11.8	-0.29	3.49
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	4.92	9.58	31.80	105.21	242.09	542.15
	%E _r	-1.60	-4.20	6.00	5.21	-3.16	8.43

9.3 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 15.00 ng/mL (QC1, χαμηλό επίπεδο)
- 150.0 ng/mL (QC2, μεσαίο επίπεδο)
- 400.0 ng/mL (QC3, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου για τις 4 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 34-46, για τις αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σετραλίνη, δεσμεθυλοσετραλίνη, βενλαφαξίνη και δεσμεθυλοβενλαφαξίνη αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 47. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

9.4 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας υαλοειδούς υγρού, για την κάθε ημέρα και οι μεγαλύτερες, κατά απόλυτη τιμή, μέσες τιμές του %E_r που παρατηρήθηκαν ήταν:

- στο χαμηλό επίπεδο ελέγχου ποιότητας (QC1)
- στο μεσαίο επίπεδο (QC2)
- στο υψηλό επίπεδο (QC3)

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου εντός της ημέρας σε υαλοειδές υγρό για τις 4 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 34-46 για τις αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σετραλίνη, δεσμεθυλοσετραλίνη, βενλαφαξίνη και την δεσμεθυλοβενλαφαξίνη αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου δια των ημερών (4 ημέρες) σε υαλοειδές υγρό παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 47. Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Πίνακας 34. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την αμιτριπυλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6)(ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	14.67 \pm 1.11	7.6	-2,23	157.2 \pm 11.3	7.2	4,80	401.6 \pm 33.4	7.8	0.40
2 ^η	14.44 \pm 1.54	10.7	-3.72	154.3 \pm 12.8	8.3	2.85	383.6 \pm 28.1	7.3	-4.11
3 ^η	14.97 \pm 1.15	7.7	-0.21	158.3 \pm 10.0	6.3	5.51	410.3 \pm 25.9	6.3	5.51
4 ^η	15.3 \pm 0.81	5.3	2.23	153.4 \pm 12.3	8.0	2.26	409.5 \pm 23.4	5.7	2.36

Πίνακας 35. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη σιταλοπράμη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	14.78 \pm 1.13	7.7	-1.49	156.7 \pm 11.4	7.3	4.47	411.0 \pm 23.0	5.6	2.75
2 ^η	14.64 \pm 1.33	9.1	-2.40	151.5 \pm 11.7	7.7	1.00	417.3 \pm 33.6	8.0	4.33
3 ^η	15.20 \pm 0.91	6.0	2.79	154.2 \pm 7.1	4.6	2.78	411.3 \pm 28.5	6.9	2.82
4 ^η	15.19 \pm 0.69	4.6	1.28	154.4 \pm 17.0	10.9	2.93	418.0 \pm 26.9	6.4	4.49

Πίνακας 36. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την κλοπιπραμίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.07 \pm 1.11	7.3	0.44	148.5 \pm 14.9	10.0	-1.00	403.5 \pm 21.8	5.4	0.88
2 ^η	15.63 \pm 1.02	6.5	4.19	150.4 \pm 10.1	6.7	0.27	380.4 \pm 25.6	6.7	-4.89
3 ^η	15.04 \pm 0.98	6.5	0.23	148.9 \pm 11.8	7.9	-0.76	403.7 \pm 14.3	8.5	0.93
4 ^η	15.42 \pm 1.09	7.1	2.79	148.6 \pm 11.1	6.8	-0.90	402.4 \pm 9.0	6.8	2.14

Πίνακας 37. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την νοτριπτυλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.37 \pm 0.74	4.8	2.49	154.5 \pm 10.6	6.9	2.49	395.5 \pm 31.5	8.0	-1.22
2 ^η	15.31 \pm 0.81	5.3	2.04	156.4 \pm 6.3	6.4	2.04	398.9 \pm 27.2	6.8	-0.28
3 ^η	14.91 \pm 0.92	6.2	-0.58	151.2 \pm 12.2	8.0	0.81	406.8 \pm 12.1	4.3	1.71
4 ^η	15.21 \pm 1.19	7.8	1.39	151.9 \pm 9.2	6.1	1.96	407.9 \pm 16.3	4.0	1.96

Πίνακας 38. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την φλουοξετίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.41 \pm 0.79	5.2	2.76	157.2 \pm 9.6	6.1	2.76	419.4 \pm 21.9	5.2	4.85
2 ^η	15.87 \pm 0.94	5.9	5.76	157.5 \pm 6.9	4.4	5.01	411.3 \pm 20.8	5.1	2.82
3 ^η	15.65 \pm 0.67	4.3	4.30	154.2 \pm 9.1	5.9	2.83	399.0 \pm 19.6	4.9	-0.26
4 ^η	15.53 \pm 0.74	4.7	3.51	151.0 \pm 8.6	5.8	0.68	403.8 \pm 22.5	5.6	0.95

Πίνακας 39. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την μαπροτιλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.37 \pm 0.94	6.1	2.43	157.4 \pm 10.7	6.8	4.93	403.1 \pm 13.0	3.2	0.78
2 ^η	15.55 \pm 1.40	9.0	3.69	156.4 \pm 10.4	6.7	4.26	396.4 \pm 27.8	7.0	-0.90
3 ^η	15.27 \pm 0.97	6.3	1.77	154.2 \pm 9.0	5.8	2.78	402.7 \pm 23.6	5.8	0.66
4 ^η	15.16 \pm 0.28	6.3	1.07	148.4 \pm 9.2	6.5	-1.06	392.2 \pm 20.7	5.2	-1.95

Πίνακας 40. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη δεσμεθυλομαπροτιλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.42 \pm 1.34	8.7	2.82	158.4 \pm 9.8	6.2	5.62	398.2 \pm 20.6	5.2	-0.46
2 ^η	15.77 \pm 1.27	8.1	5.14	152.3 \pm 5.9	3.8	1.56	388.6 \pm 32.8	8.4	-2.86
3 ^η	14.74 \pm 0.78	5.3	-1.77	155.07 \pm 7.1	4.6	3.38	411.7 \pm 24.5	5.9	2.93
4 ^η	15.35 \pm 0.82	5.3	2.36	149.1 \pm 10.3	6.9	-0.63	401.8 \pm 24.7	6.2	0.46

Πίνακας 41. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την μιρταζαπίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.44 \pm 0.66	4.3	2.93	145.6 \pm 10.6	7.3	-2.92	412.3 \pm 37.2	9.0	3.08
2 ^η	15.66 \pm 0.96	6.2	4.39	145.1 \pm 11.6	8.0	-2.42	404.5 \pm 35.4	8.7	1.14
3 ^η	14.95 \pm 1.53	10.2	-0.32	157.44 \pm 8.3	5.3	4.96	401.0 \pm 19.4	4.8	0.24
4 ^η	15.75 \pm 0.97	6.1	6.07	159.1 \pm 7.9	4.9	6.07	411.1 \pm 19.6	4.8	2.31

Πίνακας 42. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη δεσμεθυλομιρταζαπίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	14,67 \pm 0,69	4,7	-2.18	150.1 \pm 6.7	4.5	-0.17	404.3 \pm 23.3	5.8	1.08
2 ^η	14.72 \pm 1.30	8.8	-1.87	156.0 \pm 5.0	3.2	4.49	377.4 \pm 29.6	7.8	-5.65
3 ^η	15.54 \pm 0,90	5.8	3.58	156.2 \pm 7.4	4.7	4.17	408.1 \pm 23.0	5.6	2.02
4 ^η	15.41 \pm 1.22	7.9	2.70	155.4 \pm 10.8	7.0	4.38	406.7 \pm 21.8	5.3	1.67

Πίνακας 42. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη σετραλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	14.75 \pm 1.04	7.0	-1.70	154.7 \pm 9.9	6.4	3.15	411.1 \pm 25.5	6.2	2.76
2 ^η	14.98 \pm 0.88	5.8	-0.16	155.7 \pm 7.7	5.0	3.80	385.5 \pm 30.4	7.9	-3.62
3 ^η	14.25 \pm 1.08	7.6	-4.98	150.1 \pm 8.1	5.4	0.08	396.8 \pm 16.6	4.2	-0.81
4 ^η	15.09 \pm 0.56	3.7	0.60	153.1 \pm 11.8	7.7	2.07	407.6 \pm 18.5	4.5	1.90

Πίνακας 45. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη δεσμεθυλοσερτραλίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.31 \pm 0.53	3.5	2.07	148.0 \pm 9.4	6.3	-1.33	395.3 \pm 28.1	7.1	-1.17
2 ^η	15.29 \pm 0.88	5.7	1.96	150.3 \pm 14.0	9.3	0.16	412.8 \pm 24.5	5.9	3.19
3 ^η	15.48 \pm 0.87	4.4	3.17	158.6 \pm 8.7	5.5	5.73	399.6 \pm 31.7	7.9	-0.10
4 ^η	15.10 \pm 0.80	5.3	0.69	148.6 \pm 15.8	10.6	-0.92	391.3 \pm 26.5	6.8	-2.16

Πίνακας 46. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την βενλαφαξίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	14.77 \pm 1.16	7.8	-1.51	146.6 \pm 12.9	8.8	-2.27	405.6 \pm 36.5	9.0	1.41
2 ^η	14,01 \pm 1.28	9.2	-6.58	145.3 \pm 9.4	6.5	-3.14	388.0 \pm 40.2	10.4	-2.99
3 ^η	15.17 \pm 1.48	9.8	1.12	155.1 \pm 9.9	6.4	3.42	408.0 \pm 22.6	5.5	2.00
4 ^η	14.83 \pm 1.28	8.6	1.28	151.2 \pm 10.0	6.6	0.82	412.1 \pm 20.7	5.0	3.03

Πίνακας 47. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη δεσμεθυλοβενλαφαζίνη.

Ημέρα	QC1(15.00ng/mL)			QC2(150.0 ng/mL)			QC3 (400.0 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (\pm SD, n=6) (ng/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% Er)
1 ^η	15.45 \pm 1.63	10.6	2.97	149.5 \pm 8.1	5.4	-0.32	409.7 \pm 24.9	6.1	2.43
2 ^η	15.25 \pm 1.35	8.9	1.64	154.3 \pm 8.4	5.5	2.85	405.1 \pm 35.6	8.8	1.26
3 ^η	15.93 \pm 1.07	6.7	6.18	154.3 \pm 9.8	6.3	2.89	397.7 \pm 17.0	4.3	-0.58
4 ^η	15.63 \pm 0.95	6.1	4.20	153.7 \pm 11.7	7.6	2.44	412.3 \pm 21.7	5.2	3.07

Πίνακας 47. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και ορθότητα δια των ημερών (4 ημέρες) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Αντικαταθλιπτικό φάρμακο	Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	Ορθότητα δια των ημερών (ng/mL)	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (% RSD, n=24)
Αμιτριπτυλίνη	15	14.85±1.15	-0.98	7.8
	150	155.8±11.0	3.85	7.1
	400	401.2±27.8	0.30	6.9
Σιταλοπράμη	15	14.95±1.01	-0.32	6.8
	150	154.2±11.6	2.80	7.5
	400	414.4±26.6	3.60	6.4
Κλομιπραμίνη	15	15.29±1.01	1.91	6.6
	150	149.1±11.3	-0.60	7.6
	400	395.4±31.3	-1.16	7.9
Νοτριπτυλίνη	15	15.20±0.89	1.34	5.8
	150	153.5±10.0	2.32	6.6
	400	402.2±23.0	0.54	5.7
Φλουοξετίνη	15	15.61±0.76	4.08	4.9
	150	155.0±8.4	3.33	5.5
	400	408.4±21.3	2.09	5.2
Μαπροτιλίνη	15	15.34±1.02	2.24	6.7
	150	154.1±10.0	2.73	6.5
	400	398.6±21.0	-0.35	5.3
Δεσμεθυλομαπροτιλίνη	15	15.32±1.08	2.14	7.1
	150	153.7±8.7	2.48	5.6
	400	400.1±25.7	0.02	6.4
Μιρταζαπίνη	15	15.45±1.05	3.00	6.8
	150	151.8±11.2	1.21	7.4
	400	407.2±27.6	1.81	6.8
Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	15	15.08±1.62	0.56	7.0
	150	154.4±7.7	2.93	5.0
	400	399.1±26.3	-0.22	6.6
Σερτραλίνη	15	14.77±0.91	-1.56	6.2
	150	153.4±9.1	2.27	6.0
	400	400.2±24.1	0.06	6.0
Δεσμεθυλοσερτραλίνη	15	15.30±0.70	1.97	4.6
	150	151.4±12.3	0.91	8.1
	400	399.8±27.2	-0.06	6.8
Βενλαφαξίνη	15	14.69±1.29	-2.02	8.8
	150	149.6±10.7	-0.29	7.1
	400	403.4±30.5	0.86	7.6
Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	15	15.56±1.22	3.74	7.8

	150	153.0±9.2	1.96	6.0
	400	406.2±24.6	1.55	6.1

9.5 Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου σε υαλοειδές υγρό προσδιορίστηκε για την αμιτριπυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπυλίνη, φλουοξετίνη, μαπροτιλίνη, δεσμεθυλομαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, βενλαφαξίνη και την δεσμεθυλοβενλαφαξίνη, στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 48. Η απόλυτη ανάκτηση της προτριπυλίνη, υπολογίστηκε $102 \pm 4.6\%$.

Πίνακας 48. Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό

Αντικαταθλιπτικό φάρμακο	Συγκέντρωση (ng/mL) (n=6)	% απόλυτη ανάκτηση(±SD)
Αμιτριπυλίνη	15	96.5±7.3
	150	104.6±7.0
	400	91.9±7.2
Σιταλοπράμη	15	94.6±7.3
	150	98.8±7.2
	400	98.7±5.5
Κλομιπραμίνη	15	95.3±6.2
	150	98.5±6.6
	400	88.1±6.1
Νορτριπυλίνη	15	101.2±5.3
	150	97.8±6.3
	400	98.5±6.7
Φλουοξετίνη	15	95.3±4.9
	150	98.3±6.0
	400	99.1±5.2
Μαπροτιλίνη	15	101.3±9.1
	150	101.4±6.8
	400	93.2±6.5
Δεσμεθυλομαπροτιλίνη	15	102.8±7.7
	150	101.2±6.2
	400	95.7±5.0
Μιρταζαπίνη	15	96.7±4.1
	150	97.1±7.1
	400	103.1±9.3
Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	15	96.5±8.5

	150	98.5±4.3
	400	86.3.±6.8
Σερτραλίνη	15	97.3±6.9
	150	99.1±6.4
	400	95.7±5.9
Δεσμεθυλοσερτραλίνη	15	99.2±4.4
	150	94.0±10.0
	400	89.9±6.1
Βενλαφαζίνη	15	97.1±7.6
	150	93.0±8.2
	400	89.1±8.0
Δεσμεθυλοβενλαφαζίνη	15	99.8±10.6
	150	96.2±5.2
	400	99.8±6.1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ ΣΤΗ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η επικυρωμένη μέθοδος προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, εφαρμόστηκε στη συνέχεια και σε πραγματικά δείγματα υαλοειδούς υγρού που αφορούσαν υποθέσεις δικαστικού τοξικολογικού ενδιαφέροντος. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά περιστατικά. Στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού αυτού αναλύθηκαν συνολικά 24 βιολογικά δείγματα, τα οποία αποτελούσαν μεταθανάτια δείγματα υαλοειδούς υγρού και αίματος, τα οποία αναλύθηκαν στο πλαίσιο της τοξικολογικής διερεύνησης δικαστικών υποθέσεων του Εργαστηρίου.

10.1 Εφαρμογές της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό στη Δικαστική Τοξικολογία

Η αναπτυχθείσα μέθοδος προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό εφαρμόστηκε σε μεταθανάτια δείγματα υαλοειδούς υγρού δικαστικών υποθέσεων όπου είχε διαπιστωθεί η παρουσία τους κατά τη γενική τοξικολογική ανάλυση ούρων ή αίματος καθώς και σε άτομα τα οποία σύμφωνα με το ιστορικό τους λάμβαναν αγωγή με αντικαταθλιπτικά φάρμακα,. Τα δείγματα υαλοειδούς υγρού που αναλύθηκαν αφορούσαν δικαστικές υποθέσεις του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας ή υποθέσεις που εστάλησαν στο Εργαστήριο από άλλες Ιατροδικαστικές Υπηρεσίες της Ελλάδας για τοξικολογική ανάλυση. Οι συγκεντρώσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων προσδιορίστηκαν με βάση τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν την ημέρα της ανάλυσης των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 49.

Πίνακας 49. Περιστατικά δικαστικού ενδιαφέροντος που διερευνήθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε υαλοειδές υγρό με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών.

α/α	Αντικαταθλιπτικό φάρμακο	Συγκέντρωση στο αίμα (ng/mL)	Συγκέντρωση στο υαλοειδές υγρό (ng/mL)	Λόγος συγκεντρώσεων Αίμα: Υαλοειδές υγρό	Αιτία θανάτου	Ηλικία
1	Σιταλοπράμη	988	1690	0.58	Αιφνίδιος	91
2	Κλομιπραμίνη	96	208	0.46	Αιφνίδιος	51
	Σιταλοπράμη	29	12.4	2.34		
3	Φλουοξετίνη	1142	90.4	12.64	Πτώση εξ ύψους	59
4	Βενλαφαξίνη	470	370	1.27	Αιφνίδιος	54
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	528	474	1.11		
	Μιρταζαπίνη	159	23.4	6.79		
	Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	171	68.8	2.49		
5	Βενλαφαξίνη	605	604	1.00	Αιφνίδιος	80
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	279	164	1.70		
6	Σιταλοπράμη	972	602	1.61	Απαγχονισμός	78
7	Σιταλοπράμη	51.2	30.3	1.69	Ανθρωποκτονία	44
8	Σιταλοπράμη	8	20.6	0.39	τροχαίο	42
9	Σιταλοπράμη	101	506	0.20	Αιφνίδιος	42
10	Βενλαφαξίνη	705	940	0.75	Απαγχονισμός	46
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	353	298	1.18		
	Μιρταζαπίνη	25.3	19.0	1.34		
	Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	54.2	44.6	1.22		
11	Μιρταζαπίνη	69.2	266	0.26	Ατύχημα	46
	Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	137	468	0.29		
12	Σιταλοπράμη	473	904	0.52	Ατύχημα	74
13	Σιταλοπράμη	155	78.2	1.98	Απαγχονισμός	56
14	Βενλαφαξίνη	48.6	115.6	0.42	Αιφνίδιος	59
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	52.9	374	0.14		
15	Μιρταζαπίνη	189	94.8	1.99	Τροχαίο	88
	Δεσμεθυλομιρταζαπίνη	75	35.4	2.12		
16	Σιταλοπράμη	668	387	1.73	Αιφνίδιος	84
17	Σιταλοπράμη	88.2	87.9	1.00	Αιφνίδιος	87
18	Σιταλοπράμη	327	266	1.23	Αιφνίδιος	81
19	Σιταλοπράμη	586	439	1.34	Πνιγμός εντός ύδατος	82
20	Σιταλοπράμη	90.7	55.6	1.63	Αυτοκτονία με Diquat	79

21	Σιταλοπράμη	467.5	307.3	1.52	Αιφνίδιος	81
22	Βενλαφαξίνη	332.9	223.7	1.49	Αιφνίδιος	-
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	639.9	404.2	1.58		
23	Βενλαφαξίνη	339	330	1.03	Αιφνίδιος	64
	Δεσμεθυλοβενλαφαξίνη	413	322	1.28		
24	Αμιτριπτυλίνη	273	147	1.86	Αιφνίδιος	65
	Νορτριπτυλίνη	104	58.2	1.78		

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι συχνά αναγκαίος κατά την τοξικολογική ανάλυση στο πλαίσιο της διερεύνησης δικαστικών υποθέσεων, όπως σε περιπτώσεις ατυχημάτων (τροχαία, πνιγμοί εντός ύδατος, πτώσεις εξ ύψους, υπερδοσολογία), αλλά και περιστατικών αυτοκτονίας ή εγκληματικής ενέργειας. Συνήθως η μεταθανάτια συγκέντρωση μιας ουσίας στο αίμα χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο ρόλος της στην αιτία θανάτου, δεδομένου ότι η συγκέντρωση αυτή είναι υπεύθυνη για τις φαρμακολογικές επιδράσεις της ουσίας. Αυτή η προσέγγιση όμως δεν είναι πλήρης καθώς πολλές φορές δεν λαμβάνεται υπόψη η μεταθανάτια ανακατανομή της ουσίας στους διάφορους ιστούς. Πολλές φορές στα δείγματα που λαμβάνονται σε περιπτώσεις θανάτου στο πλαίσιο δικαστικής διερεύνησης τους, δύναται τα κλασσικά βιολογικά υλικά όπως το αίμα και τα ούρα να μην είναι δυνατόν να ληφθούν ή να είναι αλλοιωμένα εξαιτίας διαφόρων μεταθανάτιων φαινομένων όπως η σήψη κ.α. Το υαλοειδές υγρό αποτελεί σημαντικό βιολογικό υλικό στη Δικαστική Τοξικολογία καθώς σε αυτό εντοπίζεται ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων. Για τη διερεύνηση τέτοιων περιστατικών απαιτούνται αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε εναλλακτικά βιολογικά υγρά όπως το υαλοειδές υγρό που να συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια, ειδικότητα και εκλεκτικότητα, να είναι σχετικά χαμηλού κόστους, να απαιτούν σύντομο χρόνο ανάλυσης. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων σχετικός με την ανάλυση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, φλουοξετίνη μαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, σερτραλίνη και βενλαφαξίνη) και τεσσάρων μεταβολιτών τους (δεσμεθυλομαπροτιλίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, δεσμεθυλοβενλαφαξίνη) στο υαλοειδές υγρό χρησιμοποιώντας την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (GC-MS).

Η αναπτυχθείσα μέθοδος στο υαλοειδές υγρό είναι πρωτότυπη, αφού δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με την αναλυτική τεχνική GC-MS (EI). Επίσης, για κάποια από αυτά τα φάρμακα όπως η μαπροτιλίνη δεν υπάρχει μέθοδος προσδιορισμού στο υαλοειδές υγρό. Δίνεται έτσι η δυνατότητα

εφαρμογής της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε αυτό το βιολογικό υλικό.

Η μέθοδος αυτή σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της προσφέρει:

- υψηλά ποσοστά % απόλυτης ανάκτησης για τα υπό μελέτη αντικαταθλιπτικά φάρμακα,
- κοινή μέθοδο παραγωγοποίησης όσον υπό μελέτη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων διαθέτουν λειτουργικές ομάδες που επιτρέπουν την παραγωγοποίηση (αμινομάδες, υδροξυλομάδες),
- επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό,
- υψηλή ειδικότητα ως προς εξωγενείς ουσίες,
- χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, συνεπώς και υψηλή ευαισθησία και
- μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτών
- υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια.

Σε σύγκριση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών στον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό, η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί στα παρακάτω:

- επιτυγχάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (αμιτριπτυλίνη, σιταλοπράμη, κλομιπραμίνη, νοτριπτυλίνη, φλουοξετίνη μαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη, σερτραλίνη και βενλαφαξίνη) και 4 μεταβολιτών (δεσμεθυλομαπροτιλίνη, δεσμεθυλομιρταζαπίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, δεσμεθυλοβενλαφαξίνη) εν αντιθέσει με τις έως σήμερα δημοσιευμένες μεθόδους στις οποίες προσδιορίζεται μικρότερος αριθμός αντικαταθλιπτικών φαρμάκων [90, 99, 110, 152].
- καλύπτει ένα δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων μεγαλύτερο από άλλες δημοσιευμένες μεθόδους [99, 152].
- παρουσιάζει καλύτερη επαναληψιμότητα και ποσοστά απόλυτης ανάκτησης [99].

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα δικαστικού ενδιαφέροντος που διερευνήθηκαν με την εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου συμπεραίνεται καταρχάς ότι είναι δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό. Σε

όλες τις περιπτώσεις που ανιχνεύτηκε κάποιο αντικαταθλιπτικό φάρμακο στο αίμα, διαπιστώθηκε η αντίστοιχη παρουσία του και στο υαλοειδές υγρό.

Μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων έγινε σε υποθέσεις με ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων ($n \geq 4$). Η σιταλοπράμη στις περισσότερες περιπτώσεις (περιστατικά 6, 7, 16, 17, 18, 19, 20, 21) εμφανίζει λόγο συγκεντρώσεων μεταξύ του αίματος και του υαλοειδούς υγρού, από 1.00 έως 1.73. Σε ορισμένες περιπτώσεις (1, 8, 9, 12) η συγκέντρωση στο αίμα είναι αρκετά μικρότερη από τη συγκέντρωση στο υαλοειδές με αντίστοιχο λόγο να βρίσκεται 0.20 και 0.58. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται σε περιπτώσεις χρόνιας χρήσης του φαρμάκου παρά σε μία κατάσταση οξείας δηλητηρίασης όπως διατύπωσαν και οι Barbera και συν. [151] στις οποίες ο θάνατος πιθανότατα επήλθε ικανό χρόνο μετά την τελευταία λήψη του φαρμάκου. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις (2, 13) η συγκέντρωση της σιταλοπράμης στο αίμα είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του υαλοειδούς υγρού με τον λόγο συγκεντρώσεων να είναι μεταξύ 1.54 και 2.34. Πιθανώς αυτές οι τιμές να αντιστοιχούν σε περιπτώσεις ατόμων τα οποία είχαν λάβει το αντικαταθλιπτικό φάρμακα σε μικρό χρονικό διάστημα πριν από το θάνατο τους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ανίχνευσης της βενλαφαζίνης, η συγκέντρωσή της βενλαφαζίνης στο αίμα ήταν υψηλότερες από την αντίστοιχη στο υαλοειδές (4, 5, 20 και 21) με το λόγο συγκεντρώσεων να κυμαίνεται από 1.00 έως 1.49. Αντίστοιχα, και ο μεταβολίτης της βενλαφαζίνης, η δεσμεθυλοβενλαφαζίνη βρέθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση στο αίμα συγκριτικά με το υαλοειδές υγρό με το λόγο συγκεντρώσεων να κυμαίνεται μεταξύ 1.11 και 1.70. Σε δύο περιπτώσεις η βενλαφαζίνη βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο υαλοειδές υγρό απ' ό,τι στο αίμα (περιστατικά 10 και 14). Στη μία από αυτές (10) η συγκέντρωση του μεταβολίτη στο αίμα ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη στο υαλοειδές υγρό.

Οι συγκεντρώσεις της μιρταζαπίνης στο αίμα σε 3 υποθέσεις (4, 10, 15) ήταν υψηλότερες σε σχέση με το υαλοειδές υγρό με το λόγο συγκεντρώσεων να κυμαίνεται από 1.34 μέχρι 6.79. Στον μεταβολίτη της μιρταζαπίνης, τη δεσμεθυλομιρταζαπίνη ο λόγος αυτός ήταν μεταξύ 1.22 και 2.49. Θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως περιπτώσεις ατόμων τα οποία βρίσκονταν στην αρχή της θεραπείας τους και το αντικαταθλιπτικό φάρμακο δεν είχε κατανεμηθεί ακόμα στους ιστούς. Σε μία μόνο περίπτωση η συγκέντρωση της μιρταζαπίνης και της δεσμεθυλομιρταζαπίνης ήταν μικρότερη στο αίμα απ' ό,τι στο υαλοειδές υγρό (14).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού ενός ικανού αριθμού αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό και μελετήθηκε η κατανομή των φαρμάκων αυτών στο υαλοειδές υγρό μέσω του προσδιορισμού του λόγου των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στο αίμα προς τις αντίστοιχες του υαλοειδούς υγρού. Για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων είναι απαραίτητη η συνέχιση της μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να καταδειχθεί η σημασία της χρήσης του υαλοειδές υγρού ως εναλλακτικό βιολογικό υγρό κατά τη διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης αλλά και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών. Τα κυριότερα αντικαταθλιπτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στον Ελλαδικό χώρο και μελετήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία είναι η αμιτριπυλίνη, η νορτριπυλίνη, η σιταλοπράμη, η κλομιπραμίνη, φλουοξετίνη η μαπροτιλίνη, η μιρταζαπίνη, η σερτραλίνη και η βενλαφαξίνη. Η χρήση των εναλλακτικών βιολογικών υλικών στην Δικαστική Τοξικολογία έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές, ιδίως σε περιπτώσεις έλλειψης των κλασικών βιολογικών υγρών όπως αίματος, ούρων κλπ., σε περιπτώσεις σήψης ή πιθανής μεταθανάτιας ανακατανομής των ουσιών. Το υαλοειδές υγρό είναι ένα εναλλακτικό βιολογικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, λόγω των πλεονεκτημάτων που έχει, για την ανάλυση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματική εργασίας ήταν η μελέτη της κατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό με υπολογισμό του λόγου των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στο αίμα με τις αντίστοιχες στο υαλοειδές υγρό. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος που θα επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων καθώς και τεσσάρων μεταβολιτών τους με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών. Η αναπτυχθείσα μέθοδος παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των ήδη δημοσιευμένων μεθόδων προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο υαλοειδές υγρό που χρησιμοποιούν αέρια χρωματογραφία, καθώς επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 9 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και 4 μεταβολιτών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα δικαστικού ενδιαφέροντος στα οποία κάποια αντικαταθλιπτικά φάρμακα είχαν ανιχνευθεί είτε κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο είτε διαπιστώθηκε η παρουσία τους κατά τη γενική τοξικολογική ανάλυση του αίματος. Σε όλες τις περιπτώσεις που ανιχνεύτηκε κάποιο αντικαταθλιπτικό φάρμακο στο αίμα, διαπιστώθηκε η αντίστοιχη παρουσία του και στο υαλοειδές υγρό με τους λόγους των συγκεντρώσεων να παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση. Καθίσταται απαραίτητη η συνέχιση της μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να καταδειχθεί η σημασία της χρήσης του υαλοειδές υγρού ως εναλλακτικό βιολογικό υγρό κατά τη διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων.

Λέξεις-κλειδιά: αντικαταθλιπτικά φάρμακα, υαλοειδές, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μαζών

ABSTRACT

Antidepressants are widely used to treat depression and other psychiatric disorders. The main antidepressant drugs used in Greece and which are studied in this master thesis are

amitriptyline, nortriptyline, citalopram, clomipramine, fluoxetine, maprotiline, mirtazapine, sertraline and venlafaxine. The use of alternative biological materials in Forensic Toxicology has been highlighted by many researchers, especially in cases of lack of classical biological samples such as blood, urine, etc., in cases of putrefaction or whenever postmortem redistribution of substances is suspected. Vitreous humor is an alternative biological sample that can be used for the analysis of the antidepressant drugs because of its analytical advantages compared to other biological samples.

The purpose of this thesis was to study the distribution of antidepressant drugs in vitreous humor through the determination of concentration ratios of the antidepressant drugs in blood to the respective in vitreous humor. For this reason, an analytical method was developed for the simultaneous determination of these antidepressant drugs as well as four of their metabolites in vitreous humor with the technique of gas chromatography in combination with mass spectrometry. The developed method presents significant advantages over already published methods for the determination of the antidepressant drugs in the vitreous humor using GC/MS technique as it allows the simultaneous determination of 9 antidepressant drugs and 4 of their metabolites. This method was applied to samples of forensic interest in which antidepressant drugs had been detected either during the general unknown analysis of the blood. In all cases where an antidepressant drug was detected in blood samples, the respective antidepressant drug was also found in vitreous humor samples with a significant range in the concentration ratios. The study should be continued with more samples in order to the usefulness of vitreous humor as an alternative biological sample in the investigation of forensic cases to be proven.

Key-words: antidepressant drugs, vitreous humor, gas chromatography, mass spectrometry

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Briley, M., & Lépine. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **2011**, 3
2. Cui, R. Editorial (Thematic Selection: A Systematic Review of Depression). *Current Neuropharmacology*, **2013**,13(4), 480–480.
3. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (world health organization WHO)
4. Parker G Costs of the principal mood disorders: a study of comparative direct and indirect costs incurred by those with bipolar I, bipolar II and unipolar disorders. *J Affect Disord* **2013**; 149:46-55
5. Ευθυμίου, Κ., Μαυροϊδή, Αθ., Παυλάτου, Ε. & Καλαντζή -Αζίζι, Α. Πρώτες Βοήθειες Ψυχικής Υγείας. Ένας οδηγός για τις ψυχικές διαταραχές και την αντιμετώπιση τους. Αθήνα: Ελληνικά Γράμματα **2006**.
6. Black W. Donald, Andrea Sen C. Nancy. Εισαγωγή στην Ψυχιατρική **2015**, 147-162
7. Weber MM, Emrich HM (). "Current and Historical Concepts of Opiate Treatment in Psychiatric Disorders". *International Clinical Psychopharmacology*. **1988**, 3 (3): 255–66.
8. Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. "Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective". *J. Psychopharmacol.* **2013**,27 (6): 479–96
9. Fagervall I, Ross SB. "Inhibition of monoamine oxidase in monoaminergic neurones in the rat brain by irreversible inhibitors". *Biochemical pharmacology*. **1986**,35 (8)
10. Timbrell, John. Taylor & Francis Group. **2008**, 324–326.
11. Henn, Fritz; Sartorius, Norman; Helmchen, Hanfried; Lauter, Hans **2013**.
12. Wong, D. T., Horng, J. S., Bymaster, F. P., Hauser, K. L. & Molloy, B. B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.***1974**, 15, 471–479.
13. Stah, S. M., *Psychopharmacology of Antidepressants*, Martin Dunitz, London **1997**.
14. Viala, A., *Actual. Psychiatr.* **1982**, 4, 65 – 79.
15. Shulman KI, Herrmann N, Walker SE. "Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression". *CNS Drugs*. **2013**,27 (10): 789–97.
16. R. A. Harvey, P. C. Champe. *Φαρμακολογία (3η έκδοση)*, **2007**.
17. Billett EE. Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology*. **2004**;25(1–2):139–148
18. Beufield, P., Hell, R. C., Lewis, S. P., *Drugs* **1985**, 32, 48 – 52.
19. Bergstrom, R. F., Lemberger, L., Farid, N. A., Wollen, R. L., *Br. J. Psychiatry* **1988**, 153, 47 – 50.
20. Molley, B. B., Wong, D. T., Fuller, R. W., *Pharm. News* **1994**, 1, 6 – 9
21. Hyttel, J., *Int. Clin. Psychopharmacol.* **1994**, 9, 19 – 26.
22. Kasper, S., Hoflich, G., Scholl, H. P., M ller, H. J., *Hum. Psychopharmacol.* **1994**, 9, 1 – 12.
23. Preskorn, S. H., *J. Clin. Psychiatry* **1994**, 55, 6 – 22.
24. Robert M. Julien. *A Primer Of Drug Action: A Comprehensive Guide To The Actions, Uses, And Side Effects Of Psychoactive Drugs*. Macmillan. **2004**, p. 286

25. Εθνικό Συνταγολόγιο, **2007**.
26. Olden, K. W. The Use of Antidepressants in Functional Gastrointestinal Disorders: New Uses for Old Drugs. *CNS Spectrums*, **2005**, 10(11), 891–896.
27. Gupta, M., & Gupta, A. The use of antidepressant drugs in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **2001**, 15(6), 512–518.
28. Graham, K., & Massak, A. Alcohol consumption and the use of antidepressants. *Canadian Medical Association Journal*, **2007**, 176(5), 633–637.
29. Dong Jun Sung, Miyea Lee, Ji-Kang Park & Hyun-Jung Park. Combination of Antidepressant and Alcohol Intake as a Potential Risk Factor for Rhabdomyolysis. *Iran J. Public Health*, **2018**, 47(9), 1424-1425
30. Juurlink, D. Revisiting the drug interaction between tamoxifen and SSRI antidepressants. *BMJ*, i5309, **2016**.
31. Cazet, L., Bulteau, S., Evin, A., Spiers, A., Caillet, P., Kuhn, E., ... Victorri-Vigneau, C. Interaction between CYP2D6 inhibitor antidepressants and codeine: is this relevant? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **2018**, 14(8), 879–886.
32. Park, S. H., Wackernah, R. C., & Stimmel, G. L. Serotonin Syndrome. *Journal of Pharmacy Practice*, **2013**, 27(1), 71–78.
33. Edwards, J. G., Anderson, I., *Drugs* **1999**, 57, 507–533.
34. Montgomery, S., J. *Psychopharmacol.* **1995**, 9, 179–184.
35. Murdoch, D., McTavish, D., *Drugs* **1992**, 44, 604–624.
36. Comer, A. M., Figgitt, D. P., *CNS Drugs* **2000**, 14, 391–407.
37. Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2000**;85(1):11–28.
38. Raggi, M. A., Mandrioli, R., Pucci, V., *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 203–220.
39. Sweetman S. C. (Ed.), *Martindale The Complete Drug Reference*, 34th Edn., Pharmaceutical Press, London **2004**, p. 292
40. Ray A, Tennakoon L, Keller J, Sarginson JE, Ryan HS, Murphy GM, και συν. ABCB1 (MDR1) predicts remission on P-gp substrates in chronic depression. *Pharmacogenomics J.* **2015**;15(4):332–9.
41. Baselt RC. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 9th edition. Biomedical Publications: Seal Beach, CA, **2011**.
42. De Boer, Th., Maura, G., Raiteri, M. και συν. Neurochemical and autonomic pharmacological profiles of the 6-aza-analogue of mianserin, Org 3770 and its enantiomers. *Neuropharmacology* **1988**, 27, 399–408.
43. Jan Fawcetta, Robert L. Barkin, Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression, *Journal of Affective Disorders* 51, **1998** 267– 285
44. Montgomery, S.A. Safety of mirtazapine: a review. *Int Clin. Psychopharmacol.* **1995**, 10, 37s–54s.
45. Barkin, R.L., Lubenow, T.J. και συν. Management of Chronic Pain. *Disease-a-Month* **1996**, 142, 385–456

46. Macek J, Ptacek P, Klima J. Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, **2001**, 755: 279–285.
47. Meng Q, Gauthier D. Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction. *Clin Biochem* **2005**, 38: 282– 285.
48. Pollock BG. Citalopram: a comprehensive review. *Expert Opin Pharmacother* **2001**, 2 (4): 681 – 698.
49. Bezchlibnyk-Butler K, Aleksic I, Kennedy SH. Citalopram – a review of pharmacological and clinical effects. *J Psychiatry Neurosci* **2000**, 25 (3): 241- 254.
50. P. Baumann, F. Larsen, *Rev. Contemp. Pharmacother.* **1995**, 6, 287
51. M. Priskorn, F. Larsen, A. Segonzac, M. Moulin, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1997**, 52, 241
52. Robertson DW, Jones ND, Swartzendruber JK, και συν. Molecular structure of fluoxetine hydrochloride, a highly selective serotonin-uptake inhibitor. *J Med Chem* **1988**; 31(1):185-9
53. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* **1994**; 9(Suppl 1):19-26
54. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, και συν. Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. *Neuropsychopharmacology* **1993**; 8(4):337-44 van Harten J. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet* **1993**; 24(3):203-20
55. Bergstrom RF, Lemberger L, Farid NA, Wolen RL. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of fluoxetine: a review. *Br J Psychiatry* **1988**(3):47-50
56. Stevens JC, Wrighton SA. Interaction of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine with human liver cytochromes P450. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**;266(2):964-71
57. Lemberger L, Bergstrom RF, Wolen RL, και συν. Fluoxetine: clinical pharmacology and physiologic disposition. *J Clin Psychiatry* **1985**;46(3 Pt 2):14-19
58. Christopher Norkus, David Rankin & Butch KuKanich, Pharmacokinetics of intravenous and oral amitriptyline and its active metabolite nortriptyline in Greyhound dogs, *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, **2015**
59. About AY, Chevanne F, Le Corre P. Oral bioavailability and intestinal secretion of amitriptyline: Role of P-glycoprotein *Int. J. Pharm.* **2007**; 330(1-2):121-8
60. About AY, Chevanne F, Le Corre P. Influence of efflux transporters on liver, bile and brain disposition of amitriptyline in mice. *Int J Pharm* **2009**;378(1-2):80-5
61. Jorgensen A, Hansen V. Pharmacokinetics of amitriptyline infused intravenously in man. *Eur J Clin Pharmacol* **1976**;10(5): 337-41
62. Burch JE, Hullin RP. Amitriptyline pharmacokinetics. A crossover study with single doses of amitriptyline and nortriptyline. *Psychopharmacology. (Berl)* **1981**; 74(1):35-42
63. Kruger R, Holzl G, Kuss HJ, Schefold L. Comparison of the metabolism of the three antidepressants amitriptyline, imipramine, and chlorimipramine in vitro in rat liver microsomes. *Psychopharmacology (Berl)* **1986**;88(4):505-13
64. Rollins DE, Alvan G, Bertilsson L, και συν. Interindividual differences in amitriptyline demethylation. *Clin Pharmacology Ther.* **1980**; 28(1):121-9

65. Venkatakrishnan K, Greenblatt DJ, von Moltke LL, και συν. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP2C19 and 3A4. *J. Clin. Pharmacology* **1998**;38(2):112-21
66. Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151:737–748.
67. Food and Drug Administration. Nortriptyline hydrochloride oral solution, USP. FoodandDrugAdministration, Washington, DC .**2007**
68. Brosen K, Kragh-Sorensen P.. Concomitant intake of nortriptyline and carbamazepine. *Ther. Drug Monit.* **1993**, 15:258–260.
69. Self T, Corley CR, Nabhan S, Abell T. Case report: interaction of rifampin and nortriptyline. *Am. J. Med. Sci.* **1996**, 311:80-81.
70. von Bahr C, Steiner E, Koike Y, Gabrielsson J. Time course of enzyme induction in humans: effect of pentobarbital on nortriptyline metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1998**, 64:18–26.
71. Gannon RH, Anderson ML. Fluconazole-nortriptyline drug interaction. *Ann. Pharmacother.* **1992**,26:1456–1457.
72. Miller DD, Sawyer JB, Duffy JP.. Cimetidine’s effect on steady-state serum nortriptyline concentrations. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1983**, 17:904–905.
73. Jerling M, Merle Y, Mentre F, Mallet A. Population pharmacokinetics of nortriptyline during monotherapy and during concomitant treatment with drugs that inhibit CYP2D6: an evaluation with the nonparametric maximum likelihood method. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**38:453–462.
74. Shear N, Drake L, Gupta AK, Lambert J, Yaniv R. The implications and management of drug interactions with itraconazole, fluconazole and terbinafine. *Dermatology* **2000** 201:196–203.
75. Nemeroff CB, DeVane CL, Pollock BG. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am. J. Psychiatry* **1996**,153:311–320.
76. Loga S, Curry S, Lader M. Interaction of chlorpromazine and nortriptyline in patients with schizophrenia. *Clin. Pharmacokinet.* **1981**, 6:454– 462.
77. Gallagher HC, Gallagher RM, Butler M, Buggy DJ, Henman MC. Venlafaxine for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2015**
78. Bolden-Watson C, Richelson E. Blockade by newly developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sciences* **1993** ;52(12):1023–9.
79. Schreiber S, Backer MM, Pick CG. The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neuroscience Letters* **1999**; 273(2):85–8.
80. Eds Maddison, J., Page, S. & Church, D. Antidepressants. In *Small Animal Clinical Pharmacology* **2001** pp. 500–503.
81. Evans LE, Bett JH, και συν: The bioavailability of oral and parenteral chlorimipramine (Anafranil). *Prog Neuro-Psychopharmacol* **1980**;4: 293-302.
82. Müller FO, Schall R, και συν: Relative bioavailability of four clomipramine hydrochloride tablet products. *Biopharm Drug Disposition* **1986**;17:81-90.
83. Westenberg HGM, de Zeeuw RA, και συν: Bioanalysis and pharmacokinetics of clomipramine and desmethylelomipramine in man by means of liquid chromatography. *Postgrad Med J* **1977**; 53(Suppl. 4):124-130

84. Gex-Fabry, M., Haffen, E., Paintaud, G., Bizouard, P., Sechter, D., Bechtel, P. & Balant, L.P. Population pharmacokinetics of clomipramine, desmethylclomipramine, and hydroxylated metabolites in patients with depression receiving chronic treatment: model evaluation. *Therapeutic Drug Monitoring*, **2000**; 22, 701–711.
85. Micallef J, Blin O. Neurobiology and clinical pharmacology of obsessive–compulsive disorder. *Clin Neuropharmacol*, **2001**; 24:191 –207
86. M. Wilhelm, P. Schmidt, [Synthesis and properties of 1-aminoalkyldibenzo(b,e)bicyclo(2,2,2) octadienes], *Helv. Chim. Acta* 52 **1969**, 1385e1395.
87. P. Gareri, U. Falconi, P. De Fazio, G. De Sarro, Conventional and new antidepressant drugs in the elderly, *Prog. Neurobiol.* 61 **2000**, 353e396.
88. V. Hajhashemi, H. Sadeghi, M. Minaiyan, A. Movahedian, A. Talebi, Central and peripheral anti-inflammatory effects of maprotiline on carrageenan-induced paw edema in rats, *Inflamm. Res.* 59 **2010**, 1053-1059.
89. Boumba, V. A., Rallis, G., Petrikis, P Vougiouklakis, T., & Mavreas, V. Determination of clozapine, and five antidepressants in human plasma, serum and whole blood by gas chromatography–mass spectrometry: A simple tool for clinical and postmortem toxicological analysis. *Journal of Chromatography B*, **2016**, 1038, 43–48.
90. Cartiser, N., Bévalot, F., Le Meur, C., Gaillard, Y., Malicier, D., Hubert, N., & Guitton, J. Gas chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples. *Journal of Chromatography B*, **2011** 879(27), 2909–2918.
91. Esrafil, A., Yamini, Y., & Shariati, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 604(2), 127–133.
92. Magdalan, J., Zawadzki, M., Słoka, T., & Sozański, T. Suicidal overdose with relapsing clomipramine concentrations due to a large gastric pharmacobezoar. *Forensic Science International*, **2013**, 229(1-3), 19–22.
93. Zhou, X., Chen, C., Zhang, F., Zhang, Y., Feng, Y., Ouyang, H., Jiang, H. Metabolism and bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline in human liver microsomes and human urine. **2016**
94. Chen, X., Zheng, S., Le, J., Qian, Z., Zhang, R., Hong, Z., & Chai, Y. Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2017**, 142, 19–27.
95. Alizadeh Nabil, A. A., Nouri, N., & Farajzadeh, M. A. Determination of three antidepressants in urine using simultaneous derivatization and temperature-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Biomedical Chromatography*, **2014**, 29(7), 1094–1102.
96. Castaing, N., Titier, K., Receveur-Daurel, M., Le-Déodic, M., Le-bars Delphine, Moore, N., & Molimard, M. . Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active

- Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2007**, 31(6), 334–341.
97. Déglon, J., Lauer, E., Thomas, A., Mangin, P., & Staub, C. . Use of the dried blood spot sampling process coupled with fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry: application to fluoxetine, norfluoxetine, reboxetine, and paroxetine analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**,396(7), 2523–2532.
98. Sioufi, A., Pommier, F., & Dubois, J. P. Simultaneous determination of clomipramine and its N-desmethyl metabolite in human whole blood by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1988**, 428, 71–80.
99. Dos Santos, M. F., Yamada, A., Seulin, S. C., Leyton, V., Pasqualucci, C. A. G., Muñoz, D. R., & Yonamine, M. Liquid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Antidepressants in Vitreous Humor: Study of Matrix Effect of Human and Bovine Vitreous and Saline Solution. *Journal of Analytical Toxicology*, **2016**, 40(3), 187–193.
100. Στεφανίδου Ι., Ρήγας Δ. Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία, Εκδόσεις Γαρταγάνη, **2011**, σελ 9-11
101. Lee, X.-P., Kumazawa, T., Sato, K., & Suzuki, O. Detection of Tricyclic Antidepressants in Whole Blood by Headspace Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*,**1997**, 35(7), 302–308.
102. Mastrogianni, O., Theodoridis, G., Spagou, K., Violante, D., Henriques, T., Pouliopoulos, A., Raikos, N. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. *Forensic Science International*,**2012**; 215(1-3), 105–109.
103. Martinez, M. A., Sanchez de la Torre, C., & Almarza, E. A Comparative Solid-Phase Extraction Study for the Simultaneous Determination of Fluvoxamine, Mianserin, Doxepin, Citalopram, Paroxetine, and Etoperidone in Whole Blood by Capillary Gas-Liquid Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *Journal of Analytical Toxicology*, **2004**; 28(3), 174–180.
104. Martinez, M. A., de la Torre, C. S., & Almarza, E. A Comparative Solid-Phase Extraction Study for the Simultaneous Determination of Fluoxetine, Amitriptyline, Nortriptyline, Trimipramine, Maprotiline, Clomipramine, and Trazodone in Whole Blood by Capillary Gas–Liquid Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *Journal of Analytical Toxicology*, **2003**; 27(6), 353–358.
105. Truta, L., Castro, A. L., Tarelho, S., Costa, P., Sales, M. G. F., & Teixeira, H. M. Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2016**; 128, 496–503.
106. Jagtap, P. K., & Tapadia, K. Pharmacokinetic determination and analysis of nortriptyline based on GC–MS coupled with hollow-fiber drop-to-drop solvent microextraction technique. *Bioanalysis*, **2018**; 10(3), 143–152
107. Cosby, S. H., Craig, I., & Gill, R. Novel solid-phase extraction strategy for the isolation of basic drugs from whole blood Preliminary study using commercially available extraction

- cartridges. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1995**; 669(2), 229–235.
108. Papoutsis, I., Khraiweh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., & Athanaselis, S. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2012**; 70, 557–562.
109. Papoutsis, I., Khraiweh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., & Athanaselis, S. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2012**; 70, 557–562.
110. Evenson, M. A., & Engstrand, D. A. A SepPak® HPLC Method for Tricyclic Antidepressant Drugs in Human Vitreous Humor. *Journal of Analytical Toxicology*, **1989**; 13(6), 322–325.
111. Smith, G. A., Schulz, P., Giacomini, K. M., & Blaschke, T. F. High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Amitriptyline and Its Major Metabolites in Human Whole Blood. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1982**; 71(5), 581–583.
112. Alves, V., Gonçalves, J., Conceição, C., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine. *Journal of Chromatography A*, **2015**; 1408, 30–40.
113. Castaing, N., Titier, K., Receveur-Daurel, M., Le-Déodic, M., Le-bars Delphine, Moore, N., & Molimard, M. Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2007**; 31(6), 334–341.
114. Montenarh, D., Wernet, M. P., Hopf, M., Maurer, H. H., Schmidt, P. H., & Ewald, A. H. Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS—comparative validation in whole blood, plasma, and serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**; 406(24), 5939–5953
115. Kingbäck, M., Josefsson, M., Karlsson, L., Ahlner, J., Bengtsson, F., Kugelberg, F. C., & Carlsson, B. Stereoselective determination of venlafaxine and its three demethylated metabolites in human plasma and whole blood by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometric detection and solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**; 53(3), 583–590.
116. Steuer, A. E., Poetzsch, M., Koenig, M., Tingelhoff, E., Staeheli, S. N., Roemmelt, A. T., & Kraemer, T. Comparison of conventional liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood. *Journal of Chromatography A*, **2015**; 1381, 87–100.
117. Chia-Ni Lin, JoEtta M. Juenke, and Kamisha L. Johnson-Davis. Method Validation of a Tricyclic Antidepressant Drug Panel in Urine by UPLC-MS/MS *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **2014**; vol. 44, no. 4

118. Pouliopoulos, A., Tsakelidou, E., Krokos, A., Gika, H. G., Theodoridis, G., & Raikos, N. Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Samples after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, **2018**; 42(5), 337–345.
119. Wen Liu, Hua-lin Cai, Huan-de Li. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of venlafaxine and its three metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, **2007**; 850, 405–411
120. Martin Schulz, Stefanie Iwersen-Bergmann, Hilke Andresen and Achim Schmold Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics , Schulz και συν. *CriticalCare* **2012**
121. Adelson L, Sunshine I, Rushforth NB, Mankoff M Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval. *JForensicSci* **1986**; 8:503–514
122. Μέλη ΔΕΠ Α' Οφθαλμολογικής Κλινικής Ε.Κ.Π.Α Οφθαλμολογία
123. Δημητράκος Σ., Οικονομίδης Π. Διαγνωστικές & Θεραπευτικές Προσεγγίσεις στην οφθαλμολογία **2013**.
124. Felby S, Olsen J. Comparative studies of postmortem barbiturate and meprobamate in vitreous humor, blood and liver. *J Forensic Sci.* **1969**;14:507–514.
125. Sturner WQ, Garriott JC. Comparative toxicology in vitreous humor and blood. *Forensic Sci.* **1975**; 6:31–39.
126. Hilberg T, Ripel A, Slordal L, Bjorneboe A, Morland J. The extent of postmortem drug redistribution in a rat model. *J Forensic Sci.* **1999**; 44:956–962.
127. Pélissier-Alicot A-L, Gaulier J-M, Dupuis C, Feuerstein M, Léonetti G, Lachâtre G, Marquet P. Post-mortem redistribution of three beta-blockers in the rabbit. *Int J Legal Med.* **2006**;120:226–232.
128. De Letter EA, Belpaire FM, Clauwaert KM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, Piette MH. Post-mortem redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) in the rabbit. Part II: post-mortem infusion in trachea or stomach. *Int J Legal Med.* **2002**;116:225–232.
129. De Letter EA, Clauwaert KM, Belpaire FM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, Piette MH. Post-mortem redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) in the rabbit. Part I: experimental approach after in vivo intravenous infusion. *Int J Legal Med.* **2002**;116:216–224.
130. Coe JI. Comparative postmortem chemistries of vitreous humor before and after embalming. *J Forensic Sci.* **1976**;21:583–586.
131. Steinhauer JR, Volk A, Hardy R, Konrad R, Daly T, Robinson CA. Detection of ketosis in vitreous at autopsy after embalming. *J Forensic Sci.* **2002**;47:221–223
132. Vogel J, Hodnett CN. Detection of drugs in vitreous humor with an enzyme immunoassay technique. *J Anal Toxicol.* **1981**;5:307–309.

133. Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F, Liddi R, Chiarotti M. An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor. *Forensic Sci Int.* **2006**;156:102–105.
134. Sturner WQ, Coumbis RJ. The quantitation of ethyl alcohol in vitreous humor and blood by gas chromatography. *Am J Clin Pathol.* **1966**;46:349–351.
135. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **2006**;58:1131–1135.
136. Murthy KR, Goel R, Subbannayya Y, Jacob HKC, Murthy PR, Manda SS, Patil AH, Sharma R, Sahasrabuddhe NA, Parashar A, Nair BG, Krishna V, Prasad TSK, Gowda H, Pandey A. Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clin Proteomics.* **2014**;11:29.
137. Sonoda K-H, Sakamoto T, Qiao H, Hisatomi T, Oshima T, Tsutsumi-Miyahara C, Exley M, Balk SP, Taniguchi M, Ishibashi T. The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. *Immunology.* **2005**;116:390–399
138. Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* **2008**;22:1214–1222.
139. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* **2004**;78:715–721.
140. Cummings M, Cunha-Vaz J. Treatment of neovascular age-related macular degeneration in patients with diabetes. *Clin Ophthalmol.* **2008**;2:369–375.
141. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J.* **2010**;12:348–360.
142. Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev.* **2006**;58:1136–1163.
143. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *J Forensic Sci.* **2004**;49:820–825.
144. Harper DR. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci Int.* **1989**;43:37–44.
145. Forrest AR. ACP Broadsheet no 137: April 1993. Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses. *J Clin Pathol.* **1993**;46:292–296.
146. Wang L, Zhou W, Ren L, Liu Q, Liu L. Comparative study of two vitreous humor sampling methods in rabbits. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* **2006**;26:475–477.
147. Scott KS, Oliver JS. Vitreous humor as an alternative sample to blood for the supercritical fluid extraction of morphine and 6-monoacetylmorphine. *Med Sci Law.* **1999**;39:77–81.
148. Fernandez P, Aldonza M, Bouzas A, Lema M, Bermejo AM, Tabernero MJ. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. *J Appl Toxicol.* **2006**;26:253–257.
149. Scott KS, Oliver JS. The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines. *J Forensic Sci.* **2001**;46:694–697.

150. Anastos N, McIntyre IM, Lynch MJ, Drummer OH. Postmortem concentrations of citalopram. *J Forensic Sci.* **2002**;47:882–884.
151. Barbera N, Busardo FP, Indorato F, Romano G. The pathogenetic role of adulterants in 5 cases of drug addicts with a fatal outcome. *Forensic Sci Int.* **2013**;227:74–76.
152. Kirkton C, McIntyre IM. Therapeutic and toxic concentrations of mirtazapine. *J Anal Toxicol.* **2006**;30:687–691.